

Alonso López  
Cabrera

Estudio del catabolismo de la trehalosa de *Ustilago maydis* en estrés *in vitro* y la  
patogenicidad en plantas de maíz

2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Estudio del catabolismo de la trehalosa de *Ustilago  
maydis* en estrés *in vitro* y la patogenicidad en  
plantas de maíz

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

LBT. ALONSO LÓPEZ CABRERA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

Febrero, 2020



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



**Estudio del catabolismo de la trehalosa de *Ustilago maydis* en estrés *in vitro* y la patogenicidad en plantas de maíz**

**Tesis**

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

**Presenta:**

LBT. Alonso López Cabrera

**Dirigido por:**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

**Sinodales**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Presidente

Dr. Fidel Landeros Jaime

Sinodal

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Sinodal

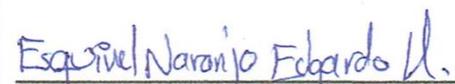
Dr. Fausto Arellano Carbajal

Sinodal

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández

Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

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

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

Centro Universitario  
Querétaro, Qro  
México  
Febrero, 2020

## Resumen.

La trehalosa es un disacárido formado por dos unidades de glucosa, está presente en hongos, plantas, bacterias, arqueas, insectos, invertebrados, más no en mamíferos. Este disacárido cumple una doble función, ya que en condiciones de estrés auxilia a la célula manteniendo la integridad de los biopolímeros y por ende contribuye en su supervivencia. Por otro lado, la trehalosa puede ser utilizada como fuente de carbono, ya que en presencia de las enzimas trehalasas, es degradada a dos moléculas de glucosa. Se ha demostrado que en la mayoría de los hongos la trehalosa se genera por la vía Tps1/Tps2, como lo es en *Ustilago maydis*, patógeno del maíz que produce la enfermedad conocida como huilacoche. Este hongo fitopatógeno es usado como modelo ya que la recombinación genética es eficaz, a partir de las esporidias haploides se pueden obtener mutantes fácilmente, existe una amplia gama de herramientas moleculares para su estudio, es posible analizar el proceso de patogenicidad en plantas de maíz de 10 días y su genoma se secuenció en el 2006. En el presente trabajo se demostró, por análisis *in silico* y experimental, la presencia del gen que codifica para trehalasa ácida (*ath1*) en *U. maydis*; además, se obtuvieron las mutantes simples  $\Delta ath1$  por recombinación homóloga y vía *in planta* la doble mutante  $\Delta ath1::\Delta nth1$ . Los resultados experimentales demostraron que los genes *ath1* y *nth1* no son esenciales para la supervivencia del hongo y el apareamiento. El crecimiento de las cepas mutantes en medio mínimo suplementado con trehalosa demostró que las enzimas Ath1 y Nth1 son indispensables para degradar la trehalosa. El aumento de la trehalosa intracelular en el basidomiceto contribuye a la protección contra el estrés oxidativo, de pared celular, la radiación UV, las bajas temperaturas y el ambiente ácido. Los ensayos de tinción con calcoflúor blanco y secreción de polisacárido al medio apuntan a que los genes *ath1* y *nth1* están involucrados en la arquitectura de la pared celular, en especial el gen *ath1*. Finalmente, respecto a la virulencia, solamente las mutantes  $\Delta ath1$  producen más signos de la enfermedad en plantas de maíz.

Palabras clave: Fitopatógeno, trehalasas, trehalosa, protección celular, *Ustilago maydis*.

## Abstract.

Trehalose is a disaccharide with two molecules of glucose, is present in fungi, plants, bacteria, archaea, insects, invertebrates but not in mammals. This disaccharide has a double function, it protects the cell in stress conditions by keeping the biopolymers integrity and could be used as a carbon source in presence of trehalases, degrading it into glucose. In most fungi trehalose is synthesized by the enzymes Tps1/Tps2, like in *Ustilago maydis* a maize pathogen also known as corn smut or huitlacoche. It is used as a model fungical phytopathogen due to the fact that genetic recombination is efficient, the yeast can produce mutants easily, its pathogenicity can be analyzed on a 10 day term in corn seedlings and its complete genome was sequenced in 2006. In this study was demonstrated by *in silico* analysis the presence of the acid trehalase (*ath1*) in this fungus, also I constructed the mutant  $\Delta ath1$  by homologous recombination and the double mutant  $\Delta ath1::\Delta nth1$  by recombination *in planta*. The experimental results demonstrated that the genes *ath1* and *nth1* are not essential for survival and mating. The mutant strains cultured in minimum media plus, trehalose showed that the enzymes Ath1 and Nth1 are the main enzymes that degrade trehalose. The increase on the amount of intracellular trehalose in the fungus provides protection against oxidative stress, cell wall stress, UV light, low temperature and acid environment stress. The results of calcoflúor white staining and polysaccharide secretion to culture media suggested that *ath1* and *nth1* genes are involved in the cell wall architecture. The  $\Delta ath1$  mutants are capable of producing more symptoms of the disease in maize plant than the wild type,  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$  strains.

Key words: Phytopatogen, trehalases, trehalose, cell protectant, *Ustilago mayis*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

*A mi familia por darme su apoyo incondicional.*

## Agradecimientos

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento al proyecto “Análisis de la función de la trehalosa y la metacaspasa *Mac1* en la respuesta a estrés y la muerte celular en *Ustilago maydis*”, con número de registro CB-2011-01, clave 165844 y por brindarme la beca de maestría de agosto del 2015 a julio del 2017. Agradezco al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación UAQ-2015 (FOFI) por el financiamiento del proyecto Alteraciones fisiológicas ante condiciones de estrés y la virulencia en cepas de *Ustilago maydis* incapaces de hidrolizar trehalosa (Registro FNB-2016-05).

Agradezco a la Dra. Georgina Berenice Cueva Torres por su apoyo en el Laboratorio de Cromatografía PlanTECC en CINVESTAV Unidad Irapuato y al Dr Fausto Arellano Carvajal por permitirme utilizar su microscopio de fluorescencia.

Agradezco a todas las personas que estuvieron involucradas en este proyecto, al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por la infinita paciencia que tubo, a los atinados comentarios y correcciones que vertieron el Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, Dr Fausto Arellano Carvajal, M. C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández y al Dr. Fidel Landeros Jaime.

Agradezco a mi familia por apoyarme incondicionalmente, a Luzmi, Daniela, David, Sol Elvira e Imelda.

Agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio Evelia, Edda, Omar, Erik, Tony, Víctor, Andrés, Lorena, Diego, Alicia por esos momentos felices en trabajo y fiestas. Agradezco a mis amigos matemáticos por su apoyo moral, a Angel, Denae y Toño, Charal, Venado, Carmen. También Agradezco a las personas que fui conociendo en la etapa final de este ciclo a Mony, Claudia y a Bertha.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	3
2.1 <i>Ustilago maydis</i> .....	3
2.1.1 Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....	3
2.3 La trehalosa.....	6
2.4 Metabolismo de la trehalosa.....	11
2.4.1 Anabolismo de la trehalosa.....	11
2.4.2 Importancia del catabolismo de la trehalosa.....	13
2.5 Función de la trehalosa en hongos.....	14
2.6 Justificación.....	17
3 Hipótesis.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1 General.....	19
4.2 Específicos.....	19
5. Materiales y Métodos.....	20
5.1 Material biológico.....	20
5.2 Construcción del cassette para interrumpir el gen <i>ath1</i> .....	22
5.3 Clonación del cassette.....	22
5.4 Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	22
5.5 Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina.....	23
5.6 Transformación de <i>Ustilago maydis</i> .....	23
5.6.1 Preparación de protoplastos.....	23
5.6.2 Transformación en hielo.....	24
5.6.3 Construcción de la cepa doble mutante $\Delta ath1::\Delta nth1$ .....	24
5.6.4 Reacción de Fuz.....	25
5.7 Extracción de ADN.....	26
5.8 Digestión con enzimas de restricción.....	26
5.9 Extracción de ARN con Trizol.....	27
5.10 Reacción en cadena de la polimerasa "PCR".....	27
5.11 Síntesis de ADNc.....	28
5.12 Crecimiento en forma de hifa.....	28
5.13 Cuantificación de trehalosa por HPLC.....	29

5.14 Crecimiento en trehalosa como única fuente de carbono.....	30
5.15 Pruebas de estrés <i>in vitro</i> .....	30
5.16 Secreción de polisacáridos al medio de cultivo.....	30
5.17 Ensayo de ayuno.....	31
5.18 Ensayo de resistencia a ultracongelación.....	32
5.19 Pruebas de patogenicidad.....	32
6. Resultados.....	34
6.1 Identificación del gen <i>Um ath1</i> .....	34
6.2 Estrategia para la delección del gen <i>ath1</i> .....	36
6.2.1 Construcción del cassette de interrupción del gen <i>ath1</i> .....	36
6.2.2 Clonación del cassette de interrupción para el gen <i>ath1</i> .....	38
6.2.3 Transformación de <i>Ustilago maydis</i> y selección de mutantes.....	38
6.3 Obtención de dobles mutantes $\Delta ath1:: \Delta nth1$ .....	39
6.4 Caracterización fenotípica de las cepas $\Delta ath1$ , $\Delta ath1:: \Delta nth1$ .....	43
6.4.1 Crecimiento en MM suplementado con trehalosa.....	43
6.4.2 Cuantificación de trehalosa.....	44
6.4.3 Respuesta a la ultracongelación de <i>Ustilago maydis</i> .....	45
6.4.4 Tolerancia al ayuno.....	46
6.4.5 Crecimiento en forma de hifa.....	47
6.4.6 Secreción de polisacárido.....	48
6.4.7 Ensayos de estrés.....	49
6.4.8 Ensayos de patogenicidad.....	51
7 Discusión.....	53
7.1 Identificación de trehalasas en <i>Ustilago maydis</i> .....	53
7.2 Acumulación de trehalosa en <i>U. maydis</i> .....	55
7.3 Comportamiento al ayuno de las cepas $\Delta ath1$ , $\Delta nth1$ y $\Delta ath1:: \Delta nth1$ .....	55
7.4 Fenotipo de mutantes $\Delta ath1$ , $\Delta ath1:: \Delta nth1$ en estrés <i>in vitro</i> .....	56
7.5 Resistencia a ultracongelación y la trehalosa en <i>Ustilago maydis</i> .....	60
7.6 Cambios estructurales en la pared celular.....	60
7.7 La trehalosa y la patogenicidad en <i>U. maydis</i> .....	61
Conclusiones.....	63
Perspectivas.....	64

Bibliografía .....	65
Apéndice .....	79

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....	5
Figura 2. Esquema de silla de la trehalosa. ....	8
Figura 3. Esquema de las teorías que explican la función protectora de la trehalosa en una proteína. ....	10
Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (BLAST). ....	34
Figura 5. Análisis predictivo de la secreción de las proteínas Ath1, Nth1 y Suc2. ....	36
Figura 6. Representación esquemática de la construcción del cassette de interrupción <i>ath1::hyg</i> .....	37
Figura 7. Construcción del cassette de interrupción <i>ath1::Hyg</i> . ....	38
Figura 8 Comprobación de mutantes $\Delta$ <i>ath1</i> por PCR y RT-PCR. ....	39
Figura 9. Reacción Fuz de las mutantes $\Delta$ <i>ath1</i> vs $\Delta$ <i>nth1</i> .. ....	40
Figura 10. Comprobación por PCR y RT-PCR de la mutación $\Delta$ <i>ath1</i> en las dobles mutantes $\Delta$ <i>ath1</i> :: $\Delta$ <i>nth1</i> . ....	42
Figura 11. Comprobación de la delección del gen <i>nth1</i> en las dobles mutantes $\Delta$ <i>nth1</i> :: $\Delta$ <i>ath1</i> . ....	42
Figura 12. Crecimiento en trehalosa como única fuente de carbono. ....	43
Figura 13. Unidades formadoras de colonia obtenidas posterior al crecimiento en trehalosa durante 48 h. ....	44
Figura 14. Concentración intracelular de trehalosa. ....	45
Figura 15. Resistencia a ultracongelación en <i>U. maydis</i> . ....	46
Figura 16. UFC recuperadas posterior al ayuno extremo en agua por 8 días ..... 47	47
Figura 17. Crecimiento de hifa de las cepas WT y mutantes $\Delta$ <i>ath1</i> , $\Delta$ <i>nth1</i> y $\Delta$ <i>ath1</i> :: $\Delta$ <i>nth1</i> . ....	48
Figura 18. Polisacáridos secretados al medio de cultivo por las cepas $\Delta$ <i>ath1</i> , $\Delta$ <i>nth1</i> , $\Delta$ <i>ath1</i> :: $\Delta$ <i>nth1</i> . ....	49
Figura 19. Respuesta a condiciones de estrés.....	51
Figura 20. Pruebas de patogenicidad en plantas de maíz de la variedad cacahuazintle. ....	52
Figura 21. Esquema propuesto del metabolismo de la trehalosa en <i>U. maydis</i> . ...	55

## Índice de tablas

Tabla 1. Colección de las cepas utilizadas en este trabajo.....	20
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo .....	21
Tabla 3. Predicción de péptido señal en proteínas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>U. maydis</i> .	35

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 1. Introducción.

La trehalosa es un disacárido presente en hongos, plantas, bacterias, arqueas, insectos, invertebrados, más no en mamíferos. La trehalosa cumple la función de fuente de carbono y de molécula protectora tipo chaperona, su síntesis en hongos se realiza por las rutas metabólicas denominadas Tps1/Tps2 y TreP, las cuales son reguladas por estímulos externos como estrés oxidativo, daño en la pared celular y por estrés osmótico. Una vez que la trehalosa cumple su función de proteger a las biomoléculas es degradada a dos glucosas por las enzimas llamadas trehalasas (Thammahong y cols., 2017; Feofilova y cols., 2014).

*Ustilago maydis* es el hongo que produce la enfermedad del maíz conocida en México como huitlacoche o carbón de maíz en el resto del mundo. Es considerado un microorganismo modelo entre los hongos fitopatógenos. Este basidiomiceto cuenta con un valor cultural en nuestro país, ya que se le conoce desde la época prehispánica y ha adquirido importancia culinaria recientemente; denominándolo “delicatessen”, sin embargo, para el resto del mundo es una enfermedad (Olicón-Hernandez y cols. 2019). *U. maydis* es objeto de estudio debido a la fácil manipulación en el laboratorio, ya que las levaduras haploides tienen un crecimiento rápido (de 12 a 24 horas), se pueden realizar ensayos de patogenicidad en plantas de maíz a temprana edad (diez días después de germinar) y la manipulación genética de las levaduras haploides facilita la obtención de mutantes debido a la eficiente recombinación homóloga (Matei y Doehlemann, 2016). Un aspecto que convierte a *U. maydis* en un modelo muy atractivo es el que su genoma fue secuenciado y publicado con acceso libre desde el año 2006 (Kämper y cols., 2006).

En *U. maydis* se identificaron dos genes que codifican dos tipos de trehalasas, una neutra (*nth1*) y otra ácida (*ath1*), sin embargo en algunos hongos poseen tres genes de trehalasas, como lo es en *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene dos trehalasas neutras (*nth1* y *ath1*) y una ácida (*ath1*) (Eleutherio y cols., 2105). También se ha descrito una trehalasa que tiene características de la

trehalasa ácida y neutra, llamada Tre1 (Foster y cols., 2003). El catabolismo de la trehalosa ha sido estudiado en los hongos *Candida parapsilosis*, *C. albicans* y *Metarhizium acridum* (Kai y cols., 2015, Sánchez-Fresneda y cols., 2015, Garre y cols 2009), mientras que en *U. maydis* previamente realizamos el trabajo con el gen *nth1* (trehalasa neutra) y generamos las mutantes nulas  $\Delta nth1$ ; éstas mostraron mayor concentración intracelular de trehalosa y mejor crecimiento ante diferentes condiciones de estrés como: ácido acético, SDS, peróxido de hidrógeno, rojo congo así como mayor índice de patogenicidad en plantas de maíz (López-Cabrera., 2016). Por este motivo en el presente trabajo estudiamos la participación de la catálisis de la trehalosa, para ello generamos las mutantes  $\Delta ath1$  así como las dobles mutantes  $\Delta nth1::\Delta ath1$ , esta colección de cepas nos permitió comprender con mayor amplitud la importancia de la catálisis de la trehalosa ante condiciones de estrés *in vitro* y la patogenicidad en este fitopatógeno. Estas metas se lograron construyendo la mutante  $\Delta ath1$  *in vitro*, y posteriormente por recombinación *in planta* se analizó la progenie obtenida de la cruce  $\Delta nth1(a1b1$ ; Higromicina B<sup>R</sup>) x  $\Delta ath1(a2b2$ , carboxina<sup>®</sup>); a partir de la selección con los correspondientes antifúngicos, carboxina<sup>®</sup> e Higromicina B<sup>®</sup> se identificaron aquellas cepas que crecieron en ambos antifúngicos como dobles mutantes  $\Delta nth1::\Delta ath1$ . En las cepas obtenidas se caracterizó su fenotipo *in vitro*, en respuesta a estrés oxidativo, osmótico y de pared celular; así como su capacidad de tolerar la ultra congelación, resistencia al ayuno, la formación de septos al crecer en forma de hifa, la secreción de polisacáridos al medio de cultivo y la capacidad de infectar plantas de maíz de 10 días de edad, en este proceso se observó que las mutantes  $\Delta ath1$  lograron un mayor porcentaje de síntomas de infección en comparación de las cepas parentales, lo cual puede ser el reflejo del fenotipo observado en las diferentes condiciones de estrés.

## **2 Antecedentes.**

### **2.1 *Ustilago maydis*.**

Los hongos son responsables de generar una gran cantidad de enfermedades a cultivos vegetales. De estos hongos los basidiomicetos son responsables de generar pérdidas económicas en el orden de millones de dólares al año, dentro de los basidiomicetos se identifica al orden de los Ustilaginales, llamados carbones (Velez-Haro y cols., 2019). Los carbones impiden la formación apropiada del grano de la planta que parasitan, ya que atacan los ovarios formando sacos de teliosporas de color oscuro, razón por la cual generan pérdidas económicas a nivel mundial y es por este síntoma característico que reciben dicho nombre. Entre los géneros más importantes de los ustilaginales fitopatógenos encontramos a: *Tilletia*, *Sphacelotheca*, *Uromyces*, *Neovossia* y *Ustilago* (Ruiz-Herrera, 2012). Del género *Ustilago* destaca *U. hordei*, *U. nuda* (patógenos de cebada), *U. nigra* (patógeno de la cebada y trigo), *U. scitaminea* (patógeno de la caña de azúcar) y *U. maydis* que es patógeno estricto de maíz y del teocintle, catalogado dentro de los 10 hongos fitopatógenos de mayor importancia a nivel mundial, se le consideró en esta lista por las ventajas que tiene su manipulación en el laboratorio, fácil recombinación genética y existe una amplia gama de herramientas de biología celular e ingeniería genética, además de que es un modelo para estudiar la interacción planta-patógeno (Dean y cols., 2012).

#### **2.1.1 Ciclo de vida de *U. maydis*.**

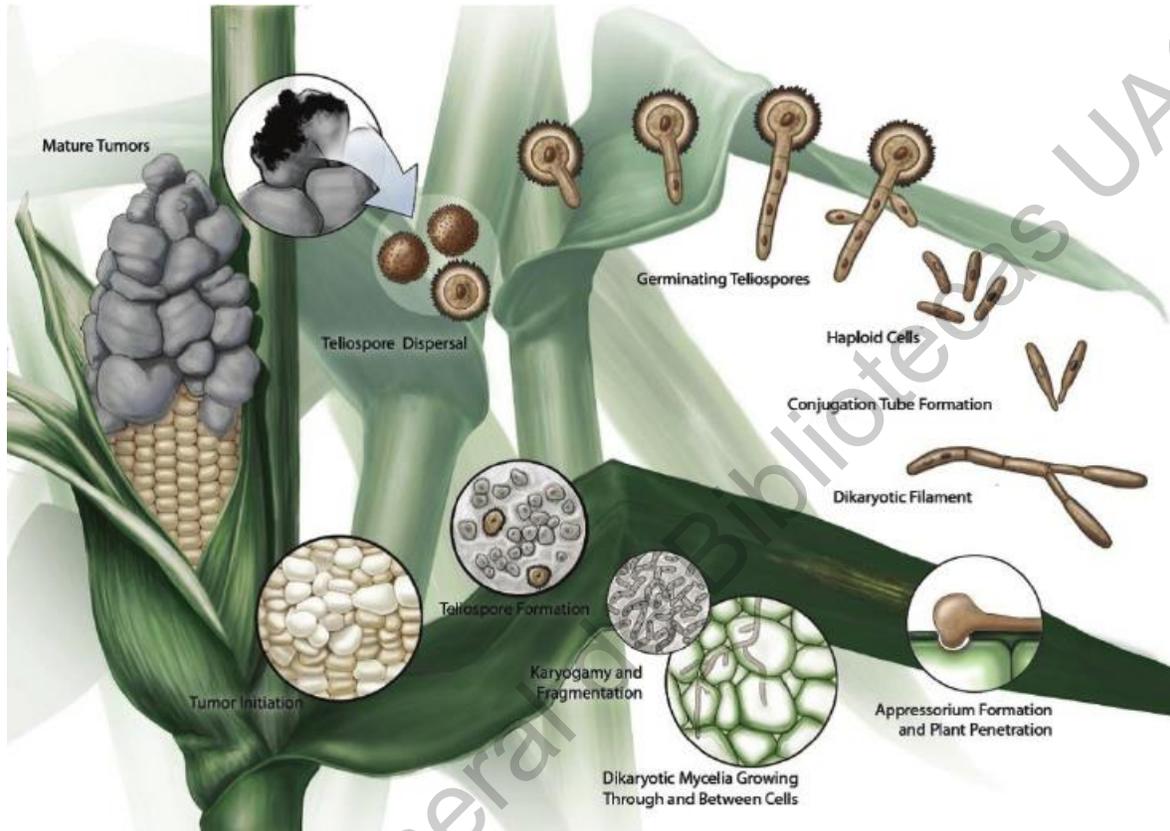
En México, la enfermedad producida por *U. maydis* comúnmente llamada huitlacoche o cuitlacoche (del náhuatl *cujtlacochi*) que significa “algo molesto que se encuentra encima (del maíz) y que es como excremento” (Valdez-Azúa, 2011). Este hongo tiene dos fases importantes dentro de su ciclo de vida, una saprófita y otra patogénica. En el estadio saprófito *U. maydis* crece en forma de levaduras haploides o esporidias las cuales se reproducen por gemación, ésta se desarrolla en los extremos de la célula formando la célula hija con un ángulo de 30° a 40° con

respecto a la célula madre. Mientras que en el desarrollo patogénico se da en planta y termina su ciclo estrictamente en maíz o teocinte (Olicón-Hernández y cols., 2019).

La fase patogénica comienza cuando dos levaduras sexualmente compatibles se reconocen, gracias a las feromonas reguladas por el *locus a*. Se ha determinado que las feromonas interactúan con receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). Estudios de la sub unidad  $\alpha$  de las proteínas G concluyeron que está compuesta de las proteínas Gpa1, Gpa2, Gpa3 y Gpa4, al eliminar la proteína Gpa3 el hongo se volvió no patogénico. La cascada de señalización que desencadena las proteínas G inhibe la formación de esporidias y propicia la formación de tubos de conjugación dirigidos a su contraparte por quimiotropismo, este proceso es regulado por la proteínas MAPK, Kpp2 y Crk1 (Olicón-Hernández y cols., 2019, Pérez-Nadales y cols., 2014, Djamei y Kahmann, 2012).

Por su parte, el *locus b* produce el heterodímero de proteínas dW/dE que activa la transcripción de genes implicados en la patogenicidad del hongo, esto ocurre en respuesta a señales específicas que provienen de la planta (Lanver y cols., 2017, Brefort y cols., 2009), además los estudios de este complejo permitieron crear una cepa “solopatogénica” la cual porta un *locus b* quimérico que inicia el proceso de infección a la planta (Brachmann y cols., 2001). Una vez que los tubos de conjugación se fusionan, de ellos emerge la hifa dicariótica, la cual constituye la forma infecciosa de *U. maydis*, capaz de colonizar la planta por medio de las aberturas naturales, como son los estomas; o bien a través de los órganos florales (Michelle y cols., 2018), la hifa dicariótica experimenta un proceso de diferenciación y forma un apresorio (Lanver y cols., 2018) el cual es indispensable para la patogenicidad como lo marcan los estudios de Castanheira y Pérez-Martín (2015) y Castanheira y cols (2014); los cuales explican a detalle que para la formación del apresorio es necesario el arresto celular en G2. El apresorio que forma *U. maydis* no genera turgencia como en *Magnaporthe grisea*; sin embargo, produce un coctel enzimático que degrada la pared celular del maíz (Lanver y cols., 2014). La formación del apresorio se da por la hidrofobicidad de la superficie de la planta y

esto es regulado por las proteínas Biz1 y Hdp2 que a su vez son coordinadas por Rbf1 y esta es regulada por el heterodímero dW/dE (Heimel y cols., 2010), ver Figura 1.



**Figura 1. Ciclo de vida de *U. maydis*.** El ciclo de vida del hongo comienza con las levaduras haploides (fase saprófita) y continúa con la formación del micelio dicariótico (fase patogénica) que ocurre al colonizar al maíz. Tomado de Saville., 2012.

El crecimiento de *U. maydis* dentro de la planta ocurre de manera intracelular y normalmente se desarrolla en los tejidos meristemáticos, además crece entre el apoplasto de las células del maíz, concluyendo con la formación de tumores o agallas que reemplazan el contenido del fruto o espiga por la presencia de teliosporas. Los tumores característicos que genera *U. maydis* se deben a que el hongo mimetiza la producción de las fitohormonas: ácido abscísico y citosinas, estas fitohormonas son parte del “secuestro” que induce el hongo a la planta aunado a los

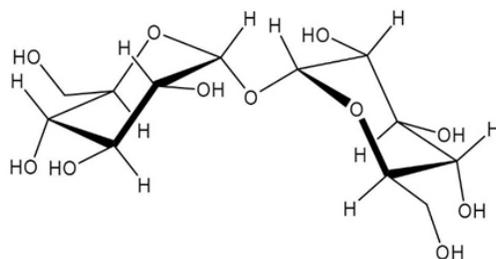
genes efectores (Morrison y cols., 2016, Brefort y cols., 2014). Las teliosporas, confieren el color negro característico del huitlacoche, la diferenciación se da cuando las hifas dicarióticas forman irregularidades hasta fragmentarse por citocinesis, una vez separadas, generan una capa equinulada pigmentada hasta tener una forma esferoide concluyendo su madurez con la cariogamia (Figura 1) (Lanver y cols., 2017, Pérez-Nadales., 2014, Djamei y Kahmann, 2012). Estudios con el gen *Unh1* demostraron que es indispensable para la maduración de las teliosporas, mutantes  $\Delta unh1$  demostraron que las teliosporas que formaron las mutantes son ovaladas y de un color marrón más tenue en comparación a las teliosporas silvestres (Colleen y cols., 2016), otro aspecto importante es que las teliosporas son viables en la intemperie por largos periodos ya que entran a un estado de dormancia (Ostrowsky y cols., 2017). Una vez que las teliosporas se encuentran fuera de las agallas y tienen las condiciones idóneas para desarrollarse, se forma el promicelio, el núcleo diploide se transporta a éste, para iniciar el proceso de la mitosis formando así cuatro células que más tarde darán lugar a las basidiosporas, a su vez éstas formarán las esporidias volviendo a iniciar el ciclo de vida de *U. maydis* (Figura 1).

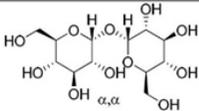
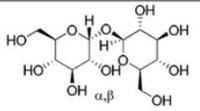
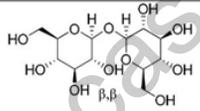
### **2.3 La trehalosa.**

El primer registro indirecto que se encontró sobre la trehalosa nos remonta al año de 1832 con Wiggers, que estudiaba al hongo fitopatógeno del centeno, el cornezuelo. Al evaporar extractos del hongo encontró que se formaron cristales dulces, incoloros, y no reductores por lo que concluyó que era algún azúcar. Veintiséis años después Berthelot extrajo cristales de trehalosa del escarabajo *Larinus nidificans*, la razón más probable de que llamara al disacárido “trehalique glucosa” fue que dicho escarabajo secreta un néctar que en medio oriente se le llama trehalamanna. Los estudios de Berthelot de la trehalosa concluyeron la fórmula condensada del azúcar ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), rotación óptica de  $208^\circ$ , ser un azúcar no reductor, tener un sabor dulce y al ser hidrolizada se convierte en un azúcar reductor (Feofilova y cols., 2014, Richards y cols., 2002).

En las primeras dos décadas del siglo XX la trehalosa era considerada un azúcar poco común, ya que solo se había logrado aislar de plantas de la resurrección, del trehalamanna y de algunos hongos. Sin embargo, en 1925 se logró extraer cristales de trehalosa de la levadura *S. cerevisiae* (Koch y Koch., 1925). En los años subsecuentes se logró detectar trehalosa en diferentes organismos como bacterias, varias plantas, insectos y una gran variedad de hongos, gracias a que se utilizó la enzima trehalasa como un método de detección más sensible (Elbain y cols., 2003). Para el año 1958 se detalló por completo su biosíntesis en *S. cerevisiae* por los investigadores Leloir y Cabib, los cuales describieron la ruta enzimática Tps1/Tps2. Con los hallazgos de la concentración de trehalosa en seres vivos, se relacionó a la trehalosa como un agente protector, dependiendo del estadio del organismo y los diferentes estímulos como pueden ser estrés: térmico, oxidativo, por bajas temperaturas, por radiación y por exposición a metales pesados, como ejemplo en los hongos *Aureobasidium subglaciale* y *S. cerevisiae* (Auesukaree., 2017, Liu y cols., 2017, Mahmud y cols., 2010 y Coutinho y cols., 1988).

La trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace  $\alpha, \alpha$ -1, 1-glucosídico por lo que es llamada  $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido. Existen tres isómeros: el isómero  $\alpha, \alpha$  que se encuentra en la naturaleza, por ende el de mayor abundancia. También existen los isómeros  $\alpha, \beta$  y  $\beta, \beta$  que solo han sido sintetizados en laboratorio. El isómero  $\alpha, \alpha$  fue dilucidado por cristalografía de rayos X en el año 1972 por Taga y cols (1972), se sabe que este isómero es el de menor energía estérica y es más estable que los isómeros  $\alpha, \beta$  y  $\beta, \beta$  (Figura 2).

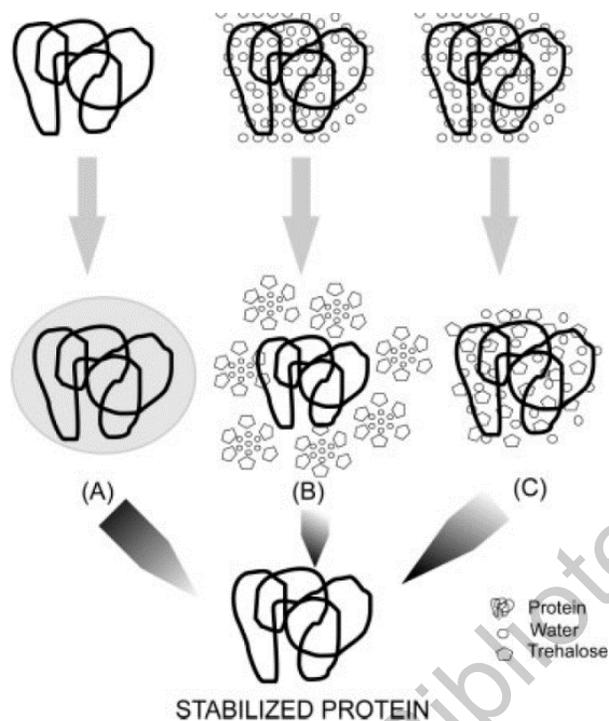


Isómeros de trehalosa			
<i>Es (kJ/mol)</i> <sup>1</sup>	92.532	98.844	110.54

**Figura 2. Esquema de silla de la trehalosa.** Se muestran los isómeros de la trehalosa y energía estática, tomado de Teramoto y cols., 2008.

Las propiedades más importantes de la trehalosa son: ser un disacárido no reductor, esto debido a que el grupo acetal de las dos moléculas están unidas por el carbono 1, 1 formando el enlace glucosídico, imposibilitando así la reducción del disacárido. Otro factor de suma importancia ser uno de los disacáridos naturales más estables, dado que la energía del enlace glucosídico que une a las dos hexosas es muy bajo (menor de  $-4.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), es inerte a las aminas, proteínas, así como aminoácidos. Por todas estas cualidades la FDA (Food and Drug Administration) le otorgó el distintivo de GRAS (Generally Recognized as Safe). Otra característica de la trehalosa es que el oxígeno del enlace glucosídico posee un patrón de distribución de agua muy diferente a los demás disacáridos, brindándole la cualidad de mantener su estructura cristalina en una solución acuosa. Además, la atracción entre la trehalosa/agua es más fuerte que la interacción agua/agua generando una organización de moléculas de agua alrededor de la trehalosa de tal manera que evita la formación de cristales de hielo de gran tamaño, este hecho hace que la trehalosa sea un excelente crioprotector y por último; la trehalosa es más resistente a la caramelización a diferencia de la sacarosa (Feofilova y cols., 2014, Teramoto y cols., 2008). Por estos motivos, no es de sorprender que la trehalosa se encuentre presente en diversos seres vivos incluyendo a los hongos.

El mecanismo exacto de como la trehalosa protege la integridad celular es desconocido, sin embargo, existen tres principales teorías que tratan de explicar este fenómeno: la vitrificación, exclusión preferencial y reemplazo de agua (Figura 3). Se propone que dependiendo de la situación que experimenta la célula, la trehalosa puede proteger al biopolímero por alguno de los tres mecanismos mencionados, por ejemplo la concentración de trehalosa es un factor importante que inclina la balanza hacia la vitrificación o al reemplazo de agua, como se demostró en el polipéptido amiloide de los islotes (secretada en las células beta pancreáticas en humanos), ya que a una concentración menor de 100 mM de trehalosa, el glúcido interactúa con el péptido, reemplazando moléculas de agua, evitando la fibrilación de la molécula, sin embargo a concentraciones mayores de 500 mM de trehalosa se propicia la formación de un “cluster supermolecular” que despoja del agua al polipéptido favoreciendo la fibrilación y así mismo el autor remarca que este fenómeno puede no suceder con otras proteínas (Cong-Heng, 2016). Por otro lado, la exclusión preferencial también tiene puntos a favor ya que en estudios realizados con RNAsa y lisozima se ha demostrado que, a temperaturas elevadas, a diferentes concentraciones de trehalosa y a diferente pH la actividad enzimática fue mayor en las soluciones que contenían trehalosa a diferencia del control sin trehalosa donde los autores atribuyeron estos resultados a la exclusión preferencial, manteniendo el plegamiento funcional de las proteínas (Jai y cols., 2003).



**Figura 3. Esquema de las teorías que explican la función protectora de la trehalosa en una proteína.** A) Teoría de vitrificación B) Exclusión preferencial C) Remplazo de agua (Jain y cols., 2009).

Según los ejemplos citados, la protección que da la trehalosa es versátil, ya que dependiendo de las condiciones existentes puede excluir moléculas de agua, o realizar el fenómeno de vitrificación o en su defecto la exclusión preferencial, es por ello que la trehalosa puede proteger contra estrés térmico, oxidativo, en la pared celular y a la vez ser un agente crioprotector (Fan y Roos, 2016; Golovina y cols., 2010).

Ante el dinamismo de la trehalosa se ha reportado su presencia en hongos, plantas, insectos, bacterias, arqueas, insectos, invertebrados, más nunca en mamíferos (Bragg y cols., 2017). La trehalosa tiene función protectora ante situaciones de estrés, esto determinado por sus propiedades fisicoquímicas. También se le atribuye la cualidad de reserva de energía ya que en presencia de la enzima trehalasa, ésta es hidrolizada a dos moléculas de glucosa, las cuales pueden ser metabolizadas vía glucólisis o por la ruta metabólica pentosas fosfato, de esta forma la trehalosa cumple una doble función dependiendo de la etapa o condición fisiológica del organismo (Barraza y Sánchez, 2013). Por ejemplo,

estudios sobre la composición de carbohidratos en la hemolinfa de insectos (*Telea polyphemus*, *Platysamia cecropis*, *Drosophila repleta*, *Oncopeltus fasciatus*, *Tribolium confusum*, *Aedes aegypti* y *Protoparce secta*) se determinó que la trehalosa es el glúcido de mayor abundancia (Zhang y cols., 2019). Estudios relacionados con el metabolismo y la movilización de la trehalosa en *Locusta migratoria*, se dilucidó que es la principal fuente energética al inicio del vuelo (Jin y cols., 2015; Thompson y cols., 2003).

Por otro lado, los estudios relacionados con la concentración de trehalosa en plantas indican que ésta no es elevada, claro ejemplo es el maíz, donde se utilizaron técnicas mucho más sensibles para poder determinar que la concentración de trehalosa se encuentra en la magnitud de nanogramos sobre mililitro (Carillo y cols., 2013). También se ha demostrado que la trehalosa tiene una función central en plantas, ya que en *Arabidopsis thaliana*, la molécula de trehalosa-6-fosfato se le ha relacionado con la concentración de sacarosa en semillas, así como en la formación de la roseta, semillas, ápices, además en algunas especies de papa y el trigo se le relacionó con los mismos síntomas (Lunn y cols., 2014). Con base en la evidencia experimental se teoriza que la trehalosa-6-fosfato es regulada por la sacarosa y viceversa manteniendo la concentración de sacarosa en plantas (Lunn y cols., 2014). Otro aspecto importante sobre el metabolismo de la trehalosa en plantas es que las mutantes incapaces de generar trehalosa-6-fosfato en *A. thaliana* mostraron fuertes defectos pleiotrópicos donde destacan: alteración en la embriogénesis, crecimiento de hojas, floración, ramificación de la inflorescencia y formación de semillas (Lunn y cols., 2014).

## **2.4 Metabolismo de la trehalosa.**

### **2.4.1 Anabolismo de la trehalosa.**

El anabolismo de la trehalosa varía dependiendo del organismo en cuestión, actualmente se conocen cinco rutas de síntesis, se sabe que en archeas, bacterias, hongos, plantas y artrópodos existe la ruta de síntesis OtsA-OtsB (Liu y cols., 2017). Por otro lado, también existe la ruta Tps1/Tps2 (TreP), esta ruta de síntesis se ha reportado en los hongos, protistas y bacterias (Eleutherio y cols., 2015). Otra ruta

anabólica de la trehalosa es la TreS donde una molécula de maltosa es transformada en trehalosa por la acción de la enzima trehalosa sintasa, esta ruta metabólica solo se ha reportado en bacterias mientras que la síntesis por las enzimas TreY-TreZ que se encargan de generar la trehalosa más glucosa a partir de malto-oligosacáridos, se ha reportado en bacterias y archeas al igual de la ruta metabólica TreT, en la que con una molécula de ADP-glucosa más glucosa se genera trehalosa con la enzima trehalosa glicosiltransferasa sintasa (Matthew y cols., 2008). Como ya se había mencionado, en hongos solo se encuentra el mecanismo de OtsA-OtsB y TreP, siendo más común el segundo (Eleutherio y cols., 2015). En el caso de *U. maydis* se comprobó que el hongo cuenta con las enzimas Tsp1/Tps2 por análisis *in silico*, estudios de las mutantes  $\Delta tps2$ , que son incapaces de producir trehalosa, demostraron la importancia de la función de la ruta Tps1/Tps2 en *U. maydis* (Cervantes-Chávez y cols., 2016).

La biosíntesis de la trehalosa en hongos por la vía TreP comienza con una molécula de glucosa unida a uridindifosfato que se condensa con una molécula de glucosa-6-fosfato, formando la trehalosa-6-fosfato por acción de la enzima Tps1. El siguiente paso de la síntesis es catalizado por la fosfatasa Tps2, que como lo indica su nombre, desfosforila el disacárido formando así la trehalosa más un fósforo inorgánico.

En *S. cerevisiae* existen las proteínas Tps3p y su homólogo Tsl1p; ambas tienen función regulatoria. Puesto que Tps3p puede ser fosforilada por la proteína cinasa A "PKA", interviniendo así vías de señalización en respuesta a estrés. Mientras que Tsl1p tiene una función estructural en la enzima Tps1 (Trevisol y cols., 2013). Recientemente en *Aspergillus fumigatus* se estudió la función de las proteínas TslA y TslB, que son los ortólogos de Tps3 y Tsl1, éstas tienen un papel importante en la arquitectura de la pared celular de dicho organismo, ya que en las mutantes  $\Delta tsl1$ , se demostró que la pared celular es más delgada en comparación a la cepa silvestre, además de ser más sensibles a estrés de pared con rojo congo, calcofluor blanco y la caspofungina (Thammahong y cols., 2017).

#### 2.4.2 Importancia del catabolismo de la trehalosa.

El catabolismo de la trehalosa se lleva a cabo a través de la enzima trehalasa (EC 3.2.1.28) la cual hidroliza el enlace  $\alpha,\alpha$ -1, 1-glucosídico que une a las dos moléculas de glucosa, quedando disponibles para entrar a otra ruta metabólica (Macakova y cols., 2013). En *S. cerevisiae* se identificaron tres trehalasas denominadas Nth1, Nth2 y Ath1 (Eleutherio y cols., 2014). Las trehalasas *Nth1* y *Nth2* tienen su actividad máxima a pH neutro, razón por la cual se llaman trehalasas neutras y se les encuentra en el citosol. El gen *nth1* se regula a nivel transcripcional por la ausencia de glucosa, estrés térmico, oxidativo u osmótico (Zähringer y cols., 1998). El promotor del gen *nth1* contiene diversos elementos de respuesta a estrés denominados STREs. (por sus siglas en inglés: stress responsive elements). Este tipo de elementos activan la transcripción en genes que lo poseen, por mencionar algunos, *CTT1*, *TPS2*, *HSP12* y *DDR2*, dichos elementos de respuesta a su vez están ligados a los factores de transcripción Msn2/Msn4, específicamente en *S. cerevisiae* estos últimos regulan la expresión basal de *nth1* de un 30 a 50 % (Zähringer y cols., 2000). En la levadura, la trehalasa neutra *Nth1* se encuentra embebida en el citosol, y es regulada por la proteína Bmh1 la cual fosforila los residuos de Ser20, Ser21, Ser60 y Ser83 que activan los dominios de calcio y provocan un cambio estructural en el sitio activo de la enzima (Macacova y cols., 2013).

A pesar de que las dos trehalasas neutras tienen una similitud del 77 % entre sí, se desconoce la función de *Nth2* (Eleutherio y cols., 2014), estudios en *S. cerevisiae* sugieren que regula la actividad de *nth1* (Garre y cols., 2009) ya que la mutante *nth1* $\Delta$  mostró mayor concentración intracelular de trehalosa que la doble mutante *nth1* $\Delta$  *nth2* $\Delta$ .

Por otro lado, existe la enzima *Ath1*, ésta tiene su actividad máxima a pH ácido. Con base en ensayos de localización vía la proteína verde fluorescente, ésta se localizó en la vacuola y en la pared celular de *S. cerevisiae* (Garre y Matallana 2009; He y cols., 2009; Parrou y cols., 2005). Otro aspecto importante que

caracteriza a las trehalosas ácidas es el que no conocen mecanismos que regulan su actividad (Thammahong y cols., 2017).

Las mutantes del gen *ath1* en *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *Metarhizium acridum* no son capaces de crecer en medio sintético suplementado con trehalosa como única fuente de carbono, confirmando así que la enzima Ath1 es esencial para la degradación de la trehalosa extracelular (Jules y cols., 2004; Sánchez-Fresneda y cols., 2015; Jin y cols., 2015). Por otro lado, la acumulación del glúcido confirió mayor tolerancia ante situaciones de estrés oxidativo, térmico y osmótico en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* (Sánchez-Fresneda y cols., 2015; Garre y Matallana, 2009 Pedreño y cols 2007). Un dato interesante es el hecho de que las mutantes *ath1Δ* de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *M. acridum* mostraron clara disminución en la virulencia, tomando en cuenta que la degradación de trehalosa extracelular es un factor crítico para colonizar al huésped (Pedreño y cols 2007; Sánchez-Fresneda y cols., 2014; Jin y cols 2015).

## **2.5 Función de la trehalosa en hongos.**

La trehalosa, por sus cualidades desempeña un rol dinámico en los hongos (Elbain y cols., 2003). Es por ello que se han realizado estudios en diferentes especies modelo centrándose en cada paso de su metabolismo tanto en su síntesis como en su hidrólisis. Se ha demostrado que la síntesis de la trehalosa tiene gran importancia en *S. cerevisiae*, el estudio de cepas mutantes carentes en el gen *TPS1* mostraron un crecimiento menor a su contraparte silvestre ante ciertas condiciones de estrés (Eleutherio y cols., 2014). En el caso de *C. albicans* se demostró que la ausencia de trehalosa resultó en la reducción de la elongación celular hasta en un 75 % a la temperatura corporal en humanos (37°C), disminuyendo así la virulencia del patógeno (Serneels y cols., 2012). Lo mismo ocurre en el hongo *C. gatti*, la ausencia del gen *tps1* generó una disminución en el crecimiento a 37°C, a demás el hongo mostró menor síntesis de melanina y la cápsula, ambos considerados factores de virulencia en este patógeno de humanos, dado estos resultados se concluyó que dichas características conllevan a deficiencias en el apareamiento,

secreción de proteínas, integridad de la pared celular, teniendo la trehalosa una función central en la virulencia de este hongo (Ngamskulrungrroj y cols., 2009).

La información relacionada con la función de la trehalosa en hongos fitopatógenos es escasa, recientemente en *U. maydis* se reportó su importancia durante la respuesta a estrés osmótico y térmico, considerando el aumento en la concentración de la trehalosa intracelular (Salmerón y cols., 2011). De manera similar en *U. maydis*, la ausencia de trehalosa condiciona la respuesta del hongo ante diferentes tipos de estrés, y en relación a la patogenicidad, las mutantes  $\Delta tps2$  que no producen trehalosa, la virulencia se afectó en comparación con las cepas silvestres (Cervantes-Chávez y cols., 2016).

Como ya se mencionó, el catabolismo de la trehalosa ha sido ampliamente estudiado en hongos modelo o patógenos de humanos como son: *S. cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *C. albicans* o *C. neoformans* (Garre y Matayana., 2009; Svanström y cols., 2012; Serneels y cols., 2012). Mientras que los estudios encaminados a entender la función fisiológica de la hidrólisis de este disacárido en hongos fitopatógenos es casi nula. A la fecha, conocemos el caso del hongo patógeno del arroz *M. grisea*. En este organismo se identificó un único gen que codifica la trehalasa neutra denominada *nth1* y se dilucidó que tiene un rol importante al momento de colonizar el tejido de la planta, así como durante la esporulación. Estudios en la mutante  $\Delta nth1$  mostraron que produce menor número de lesiones en comparación a la cepa parental en la planta de arroz (Foster y cols., 2003).

Otro fitopatógeno estudiado en este aspecto es *Botrytis cinerea*, el cual ataca aproximadamente a 230 especies de plantas, algunas de interés agronómico. Las mutantes  $\Delta tre1$  son más resistentes al estrés térmico, aunque la capacidad para colonizar la planta no cambió (Doehlemann y cols., 2006). Otro ejemplo es el hongo entomopatógeno *M. acridum*, se observó, que, al eliminar el gen *atm1* la patogenicidad del hongo se redujo drásticamente (Kai y cols., 2015). Otro caso interesante es lo reportado en el ascomiceto patógeno de humanos *C. parapsilosis*, al igual que *U. maydis* solo tiene una trehalasa ácida y una neutra. Los resultados en patogenicidad llevados a cabo en larvas de *Galleria mellonella*, mostraron que la

mutante *act* $\Delta$  *KO* (*ath1*) tuvo porcentajes de supervivencia similares a la cepa parental, mientras que con el ensayo realizado con la doble mutante *atc/ntc1*  $\Delta$  *KO*, aumentaron los porcentajes de supervivencia de las larvas (Sánchez-Fresneda y cols., 2015).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 2.6 Justificación.

La incapacidad de hidrolizar a la trehalosa en los hongos, conduce a fenotipos interesantes como son la resistencia a estrés, alteraciones en la construcción de la pared celular, cambios en el comportamiento respecto a su capacidad infectiva. La función de las trehalasas en hongos fitopatógenos es escasa, las mutantes de la trehalasa neutra de *B. cinerea*, presentaron alteración en la germinación y patogenicidad. En el caso de *M. grisea* la eliminación del gen *nth1*, produce mutantes que, aunque crecen de manera similar a la cepa silvestre, mostraron una menor tasa de infección en plantas de arroz, mientras que en las mutantes  $\Delta TRE1$  (que comparte características con los dos tipos de trehalasas) fue dispensable para la patogenicidad.

Con base en los antecedentes que indican que las mutantes  $\Delta nth1$  de *U. maydis* son más resistentes a condiciones de estrés, consideramos que es importante elucidar la participación de la trehalasa ácida Ath1, así como la ausencia del catabolismo de la trehalosa en las dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$  en *U. maydis*, ya que éste es un excelente modelo para el estudio de la interacción planta patógeno. Aunado a ello, el hecho de que en *C. neoformans*, las mutantes  $\Delta nth2$  resultaron ser más exitosas para infectar a su huésped, existe la posibilidad de que un fenotipo similar sea observado en *U. maydis*, al ser ambos basidiomicetos, en el caso de *U. maydis* se podría reflejar en cepas más agresivas para infectar al maíz; resultados que podría incidir directamente en la producción de huitlacoche. Por otro lado, un escenario similar al reportado en *B. cinerea* y *M. grisea*, permitirían diseñar estrategias que contemplen al catabolismo de la trehalosa como mecanismo de control para diferentes hongos fitopatógenos ya sean de los carbonos o de las royas ya que son patógenos de diferentes cereales.

### 3 Hipótesis

- Las mutantes ( $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$ ) de *Ustilago maydis* acumulan mayor cantidad de trehalosa intracelular, dicha acumulación afecta la patogenicidad y la respuesta fisiológica *in vitro* ante condiciones de estrés oxidativo, ácido, osmótico, ultracongelación y de pared celular.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 4. Objetivos

### 4.1 General

- Estudiar la importancia de la degradación de la trehalosa en las respuestas fisiológicas a estrés *in vitro* y la patogenicidad de *U. maydis* en plantas de maíz.

### 4.2 Específicos

- Caracterizar la respuesta a estrés oxidativo, ácido, osmótico, de pared celular y ultracongelación *in vitro* en las mutantes  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$ ,  $\Delta nth1::\Delta ath1$ .
- Determinar la acumulación de trehalosa en las mutantes,  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1::\Delta ath1$  en respuesta a estrés oxidativo.
- Comparar la capacidad infectiva de las mutantes  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1::\Delta ath1$  en plantas de maíz.

## 5. Materiales y Métodos.

### 5.1 Material biológico.

Las cepas de *U. maydis* utilizadas en este trabajo se encontraban en estado de conservación a -80°C, y se recuperaron en medio completo (MC) sólido (Holliday, 1961), y se integraron a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular-UAQ (Tabla 1). La selección con Higromicina B® se realizó con 200 µg/mL (Invitrogen®) y carboxina 5 µg/mL (Sigma-Aldrich®), según sea el caso. La cepa de *Escherichia coli* Top 10 se utilizó para la replicación de plásmidos.

Tabla 1. Colección de las cepas utilizadas en este trabajo				
Cepa	Sexo	Resistencia	Genotipo	Origen
FB1	a1b1	No aplica	WT	Banuet y Herkowitz, 1995
FB2	a2b2	No aplica	WT	Banuet y Herkowitz, 1995
68	a1b1	Carboxina	$\Delta nth1$	López-Cabrera, 2016
255	a2b2	Carboxina	$\Delta nth1$	López-Cabrera, 2016
ALC563	a1b1	Higromicina B	$\Delta ath1$	Este trabajo
ALC567	a1b1	Higromicina B	$\Delta ath1$	Este trabajo
ALC569	a2b2	Higromicina B	$\Delta ath1$	Este trabajo
ALC601	a2b2	Higromicina B	$\Delta ath1$	Este trabajo
ALC610	a1b1	Carboxina/Higromicina B	$\Delta ath1:: \Delta nth1$	Este trabajo
ALC611	a2b2	Carboxina/Higromicina B	$\Delta ath1:: \Delta nth1$	Este trabajo
ALC612	a2b2	Carboxina/Higromicina B	$\Delta ath1:: \Delta nth1$	Este trabajo

ALC614	a1b1	Carboxina/Higromicina B	$\Delta ath1:: \Delta nth1$	Este trabajo
--------	------	-------------------------	-----------------------------	--------------

Para realizar los estudios de patogenicidad se utilizaron semillas de maíz de la variedad “cacahuazintle” crecidas en condiciones de invernadero. Los oligonucleótidos utilizados se sintetizaron en la compañía Sigma®, se diseñaron con el programa Vector NTI® (Tabla 2).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo**

Número	Secuencia	Tm °C	Región que flanquean
1071 R	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	64	UTR-3'-5' pDONOR
1072 D	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	64	UTR-5'-3' pDONOR
1744 R	CACCGGTCCCTCTTACTCAG	64	ORF-CBX $\Delta nth1$
2032 D	AACCATAGCGTTTCGAGACCA	62	ORF-NTH1
2035D	CTTCCTGACGGACAGGTGAT	63	ORF-actina
2036R	CTCGGGAGGAGCAACAATC	63	ORF-actina
2037 D	CGTGGTAACGTCTGCTCTGA	62	EF-1 $\alpha$
2038 R	ACCGGACTTGATGAACTTGG	62	EF-1 $\alpha$
2087 R	ATAACCATAGCGTTTCGAGAC	64	ORF-nth1
2088 D	GAAACTCAATCGGACGCACC	64	ORF-nth1
2103 D	GTGGGACTTTGCCAACGCCT	61	ORF-ath1
2104 R	CGTCTCGTTGATCGCGCTAC	61	ORF-ath1
2105 D	CCCAAGCTTCTCGCAACGGACGGTGATGG	64	UTR-5'-3' <i>ath1</i>
2106 R	TTCAGCATCTTCTCACGTCC	61	UTR-5'-3' <i>ath1</i>
2107 D	CTTCGGTCACCAGCGCGGCTTGATACGCCTATTTTATA G	62	Oligonucleótido quimérico <i>ath1</i> - <i>hph</i>
2108 R	CTATAAAAATAGGCGTATCAAGCCGCGCTGGTGACGGA AG	62	Oligonucleótido quimérico <i>hph</i> - <i>ath1</i>
2109 D	ATCGACGCGGAAGGCAACCCCGGGTCCGGTGGAGAGT ACG	62	Oligonucleótido quimérico <i>hph</i> - <i>ath1</i>
2110 R	CGTACTCTCCACCGGACCCGGGGTTGCCTTCCGCGTCCG AT	62	Oligonucleótido quimérico <i>ath1</i> - <i>hph</i>
2111 R	TCATCTCATCGTCCGAGCCT	61	UTR-3'-5' <i>ath1</i>

2112 R	CACAAGCTTGAGTTGGCCTCTCGACTGTT	64	UTR-3'-5' <i>ath1</i>
2114 D	GGG CAC AGC AGG CTC AGG C	64	ORF- <i>ath1</i>
HYG 3 D	GATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCG	64	ORF- <i>hyg</i>
TAZ-1F D	CTTCTGATTGAGCTGCTTCC	64	ORF- <i>ath1</i>
TAZ-1R	CCTGGAATCACAAACACACG	64	ORF- <i>ath1</i>
TAZ-2F D	GAGGATCAAGACAAGGCGACG	63	ORF- <i>nth11</i>
TAZ-2R R	GTGAGGTTGAGGGAAGGACGCTCC	63	ORF- <i>nth1</i>

R, reverso, D, directo,

## 5.2 Construcción del cassette para interrumpir el gen *ath1*.

Para llevar a cabo esta construcción, se utilizó el método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de doble unión (Davidson y cols., 2002). Se amplificó el fragmento 5'UTR y el 3'UTR del gen *Um02218* (*ath1*). Para el 5'UTR se tomaron 867 pares de bases (pb) (oligonucleótidos 2105/2108) y 3'UTR 867 pb (oligonucleótidos 2109/2112). Del vector pNebuH se amplificó el fragmento de 2680 pb que corresponde al gen *HPH* (gen de resistencia a Higromicina B<sup>®</sup>), oligonucleótidos 2107/2110. Los tres fragmentos se purificaron con el Kit QG<sup>®</sup> según lo descrito por la casa comercial (Qiagen<sup>®</sup>). Se unieron los fragmentos por PCR para obtener el cassette de interrupción de 4,213 pb, según el protocolo de Davidson y cols. (2002) con la ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum<sup>®</sup> Invitrogene<sup>®</sup>, para ello se utilizaron los oligonucleótidos 2106/2111. La identidad de la banda amplificada se comprobó con enzimas de restricción, así como por secuenciación del ADN (Langebio, Irapuato).

## 5.3 Clonación del cassette.

El cassette de interrupción obtenido se clonó en el vector TOPO TA Cloning Kit<sup>®</sup>, para ello se siguieron las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogene<sup>®</sup>). Una vez clonado el vector de interés se dializó en membrana de 0.025 µm (Milipore<sup>®</sup>), para transformar células electrocompetentes Top 10 de *E. coli*.

## 5.4 Transformación de *Escherichia coli*.

Para amplificar el vector de interrupción del gen *ath1* se transformó la cepa Top 10 de *E. coli*. Se utilizó el (electroporador "Eporator" Eppendorf<sup>®</sup>). Las

transformantes se recuperaron en medio LB sólido, más carbenicilina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Cb) y kanamicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Km), así como  $40 \mu\text{L}$  de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactopiranosido (Stock  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  en dimetilsulfóxido DMSO) de acuerdo a lo sugerido en el manual del TOPO clon<sup>®</sup>.

### **5.5 Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina.**

Se creció la cepa de *E. coli* Top 10 de interés en medio suplementado con el antibiótico de selección, el cultivo se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 18-25 h. Las células se recuperaron en la centrifuga a 13,000 RPM por 3 min, la pastilla celular se homogeneizó con  $200 \mu\text{L}$  de solución I (25 mM Tris pH 8.5, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa), se adicionaron  $400 \mu\text{L}$  de solución II (1 % SDS, 0.2 M NaOH) e incubó 10 min en hielo. Se adicionaron  $300 \mu\text{L}$  de la solución III (3 M acetato de potasio, 12 % ácido acético glacial) y se homogeneizó e incubó en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM por 10 min y se recuperó el sobrenadante (SN), en tubos nuevos, para adicionar  $600 \mu\text{L}$  de isopropanol frío y se dejó incubar 30 min a  $-20^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12,000 RPM por 10 min, se decantó el SN y la pastilla se lavó con  $300 \mu\text{L}$  de etanol frío al 70 %. A continuación, se centrifugó por 5 min a 12,000 RPM y se desechó el SN. Para secar la pastilla se colocaron los tubos en posición invertida. Finalmente se disolvió el ADN con agua grado biología molecular.

### **5.6 Transformación de *Ustilago maydis*.**

#### **5.6.1 Preparación de protoplastos.**

Se transformó a *U. maydis* según el protocolo de Tsukuda y cols. (1988). Se inocularon las cepas parentales en medio YEPS 100 ml (1 % extracto de levadura, 2 % bacto-peptona, 2 % sacarosa) en tres matraces diferentes y se seleccionó el matraz que tuviera una densidad óptica (D.O.) cercana a 0.8. Las células se centrifugaron a 2,500 RPM por 5 min, se eliminó el SN y suspendió la pastilla en 10 mL de SCS (20 mM citrato de sodio pH 5.8, 1 M sorbitol), para repetir la centrifugación 2,500 RPM por 5 min, se desechó el SN y suspendieron las células en 1 mL de SCS. Se agregaron  $600 \mu\text{L}$  de enzimas líticas de *Trichoderma* (100 mg

mL<sup>-1</sup> Sigma Aldrich®), la suspensión se agitó a 20 RPM en agitador orbital durante 10 a 30 min, simultáneamente se analizaron las muestras en el microscopio para verificar la formación e integridad de protoplastos. Estos se recuperaron por centrifugaron a 996 RPM por 10 min, se desechó el SN y suspendió en 1 mL de SCS. Se cambió la suspensión celular a un tubo de 1.5 mL, se eliminó el SN para volver a suspender la pastilla en 1 mL de SCS, se centrifugó nuevamente a 2,000 RPM por 5 min y se homogeneizó de nuevo en 1 mL de STC (1 mM pH 7.5 Tris-HCl, 100 mM cloruro de calcio, 1 M sorbitol) para volver a centrifugar a 2,000 RPM por 5 min, ya eliminado el SN se agregó 1 mL de STC frío y se adicionó 7 % (v/v) de DMSO en caso de conservar los protoplastos a -80°C.

### 5.6.2 Transformación en hielo.

Se colocó 1 µg del ADN transformante (disuelto en 5 µL de STC) y 1 µL de heparina (15 mg mL<sup>-1</sup> heparina en STC) a una alícuota de la suspensión de protoplastos (50 µL), se incubó en hielo por 10 min. Posteriormente se agregaron 500 µL de polietilenglicol 4,000 (40 % peso/volumen en STC), se incubó por 10 min en hielo. Transcurrido el tiempo se colocaron 500 µL de STC frío y se mezcló la solución por inversión. Se centrifugó a 2,000 RPM por 5 min, se desechó el SN y se suspendió en STC. Finalmente se sembró la suspensión en medio completo doble más sorbitol (DCMS) suplementado con 200 µg mL<sup>-1</sup> de Higromicina B®.

Se utilizaron cajas control donde se agregó la suspensión celular de protoplastos a la caja de DCMS sin Higromicina B® para comprobar la viabilidad de los protoplastos. Control negativo, sembrar las cepas en DCMS con Higromicina B® sin ADN transformante, con el fin de comprobar que el antifúngico cumplió la función de seleccionar. Por último, se sembraron las cepas con el ADN transformante en DCMS con Higromicina B® para seleccionar las cepas de interés. Las cajas se incubaron a 28°C y se observó el crecimiento periódicamente por 72 h.

### 5.6.3 Construcción de la cepa doble mutante *Δath1::Anth1*.

Para obtener las dobles mutantes de los genes de las trehalasas en *U. maydis*, se aprovechó el ciclo sexual del hongo. Para ello se prepararon y mezclaron

una suspensión de células a una concentración  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de la cepa 68 mutante  $\Delta nth1$  a1b1 cbx<sup>R</sup> y de la cepa 569 mutante  $\Delta ath1$  a2b2 hyg<sup>R</sup>. La mezcla de cepas se inyectó en plantas de maíz de 10 días de edad, según lo reportado por Chavan y cols (2014). Se analizaron las plantas periódicamente hasta que los tumores maduraron (1 mes). Se siguió el protocolo de extracción de teliosporas descrito por Christensen y cols (1963), los tumores se colectaron y se maceraron con agua destilada estéril para extraer las teliosporas. Se eliminó el micelio y las levaduras con un tratamiento de dos horas con sulfato de cobre al 2 %, suplementado con carbenicilina/kanamicina a la concentración de 100 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. Se lavaron las teliosporas dos veces con agua destilada estéril (centrifugar 3,000 RPM por 5 min). Una vez aisladas las teliosporas se diluyeron 1:10 y 1:100, de cada dilución se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  y se sembraron en MC, ya que germinaron durante 24 a 36 h a 28°C, se recuperaron las colonias con palillos en una solución 300  $\mu\text{L}$  de MC líquido en un tubo cónico de 1.5 mL y se mezclaron por agitación (vortex) para separar las esporidias. Se prepararon diluciones 1:100 y 1:1,000 de dicha suspensión, a continuación, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de en MC selectivo suplementado con carboxina<sup>®</sup> (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), Higromicina B<sup>®</sup> (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se incubaron las cajas a 28°C durante 48 h y se recuperaron aquellas cepas con el fenotipo de interés (resistente a ambos antifungicos). Para determinar el sexo de las cepas se llevó a cabo la reacción de Fuz, se cruzaron las cepas de interés con las silvestre a1b1 y a2b2 de manera independiente, seleccionando aquellas cepas hyg<sup>R</sup> cbx<sup>R</sup> (resistentes) del sexo a1b1 y a2b2.

#### 5.6.4 Reacción de Fuz.

Se crecieron las cepas de interés en MC líquido durante 18-24 h en agitación constante a 28°C. Se colocó una gota de 10  $\mu\text{L}$  de la cepa haploide (a1b1) y sobre esta se vertió una gota de 10  $\mu\text{L}$  de la cepa sexualmente compatible (a2b2), se hicieron las combinaciones  $\Delta nth1$  x  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1$  x  $\Delta ath1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$  x  $\Delta ath1::\Delta nth1$  y WT (FB1 x FB2), así como la cepa WT con todas las mutantes ( $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$ ). Las gotas se secaron en la campana de flujo laminar

y se incubaron a temperatura ambiente durante 18 h a 24 h, según lo reportado por Banuett y Herkowiz. (1995).

### **5.7 Extracción de ADN.**

Se inocularon la cepa de interés en 10 mL de cultivo de MC suplementado con el antifúngico correspondiente, se incubaron a 28°C por 18-24 horas en agitación constante. Se centrifugó el cultivo, se desechó el SN y la pastilla se suspendió con 200 µL de tampón TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA) se vertieron 400 µL de tampón de extracción TSNTE (2 % Triton X 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA) después se adicionaron 400 µL de fenol-cloroformo (1:1), se agitaron en vortex por 5 min. Posterior a ello, se centrifugó la muestra a 12,000 RPM por 10 min, se recuperó el SN y se colocó en un tubo cónico de 1.5 mL nuevo y se adicionaron 3 µL de RNAsa (10 mg mL<sup>-1</sup>) se incubó a 37°C por 20 min. Transcurrido el tiempo se adicionó un volumen de 300 µL de cloroformo, se agitó en vortex (1 min) y se centrifugó a 12,000 RPM por 10 min, al repetir una vez más este paso se recuperó el SN en tubos nuevos. Se adicionó al SN un décimo del volumen obtenido de acetato de sodio 3 M (estéril) y dos volúmenes de etanol absoluto frío para incubarlo a -20°C por media hora, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se eliminó el SN y se lavó la pastilla con 350 µL de etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente y se eliminó el SN para dejar secar la pastilla invirtiendo el tubo, finalmente se disolvió el ADN con agua grado biología molecular.

### **5.8 Digestión con enzimas de restricción.**

La digestión enzimática del ADN se realizó de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial de las enzimas de restricción utilizadas. De manera general a 1 µg de ADN se mezcló con el tampón correspondiente a la enzima, se incubó a 37°C por 90 min. Transcurrido el tiempo de reacción, la muestra se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando como marcador de peso molecular

1 Kb o 100 pb Thermo®. Como tampón de corrida se utilizó TAE (40 mM Tris acetato pH 8, 1 mM EDTA y 40 mM de ácido acético).

### **5.9 Extracción de ARN con Trizol.**

La cepa de interés se creció en las condiciones indicadas en cada experimento, se centrifugó 5 min por 4,000 RPM. Se congeló la pastilla de células con nitrógeno líquido, se trituró con pistilo y mortero (estériles) hasta obtener polvo fino (mantener la muestra congelada): el ARN total se purificó de aproximadamente de 150 µL (polvo fino) que se homogeneizó con 1 mL de Trizol (Invitrogen®), se incubó por 5 min a temperatura ambiente (TA), se añadieron 200 µL de cloroformo y se mezcló. Posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM a 4°C por 15 min, el SN se transfirió a otro tubo libre de RNAsas. Se realizó una purificación con 500 µL de cloroformo. Se centrifugó a 12,000 RPM por 5 min a 4°C y se recuperó el SN en otro tubo. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaron con 600 µL de isopropanol y 500 µL de la mezcla de cloruro de sodio 1.2 M y citrato de sodio 0.8 M, se incubó a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM durante 10 min a 4°C y se descartó el SN. La pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70 % y se disolvió en 50 µL de agua DEPC al 0.1 % (Dietil pirocarbonato). La concentración de ARN se cuantificó a 260 y 280 nm en el Nanodrop (Thermo Scientific®). Todos los reactivos utilizados se prepararon con agua-DEPC y se esterilizaron.

### **5.10 Reacción en cadena de la polimerasa “PCR”.**

La reacción de PCR, realizó en el termociclador BioRad® T100. Para ello se utilizó la Taq ADN Polimerasa recombinante de Invitrogen® siguiendo las instrucciones de esta casa comercial. La temperatura de alineamiento de cada par de oligonucleótidos se determinó de manera experimental (Tabla 1). Cuando fue necesario se utilizó la DNA polimerasa de alta fidelidad (Roche®).

### 5.11 Síntesis de ADNc.

Se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de ARN total a una concentración de 400  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ , esta muestra se trató con DNasa I a 37°C por 35 min, se detuvo la reacción con 1  $\mu\text{L}$  de EDTA a 50 mM y se inactivó la enzima 65°C por 10 min, según lo indicado por la casa comercial (ThermoScientific®). Para la síntesis del ADNc se agregó el oligonucleótido de dT 100 pM, dNTPs a 10 mM, tampón de reacción y DTT a 0.1 M, después se incubó a 42°C por 50 min utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen®). Posteriormente se analizó la expresión de los genes *Umnth1* y *Umath11* con los oligonucleótidos específicos, 2141/2104 (503 pb), TAZ-1F/2104 (572 pb) (ambos pares amplifican un fragmento del ORF del gen *ath1*), TAZ-2F/2087 (600 pb) amplifica un fragmento del gen *NTH1*, además de los controles de actina 2035/2036 (279 pb) y factor de elongación 1 $\alpha$  2037/2038 (250 pb) se corrió la muestra en un gel de agarosa al 1.2 % por 20 min a 100 V. El gel se observó en el transiluminador de BioRad® Gel Doc XR.

### 5.12 Crecimiento en forma de hifa.

La capacidad para crecer en forma de hifa se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Holliday (1961). Para ello las cepas de interés se crecieron en medio MC líquido durante 18 h a 28°C en agitación constante de 150 RPM. Posteriormente las células se concentraron por centrifugación a 3,000 RPM por 5 min. Se eliminó el SN y el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente las células se suspendieron en el volumen original del cultivo con agua destilada estéril y se incubaron por 4 h a 28°C a 150 RPM (periodo de ayuno). A continuación, las células se mantuvieron a 4°C por 3 h para inocular ( $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) en medio mínimo pH 7 (MM pH 7) que induce el crecimiento en forma de levadura y medio mínimo pH 3 (MM pH 3) en el cual se induce el crecimiento en forma de hifa. Se confirmó el crecimiento en forma de hifa al microscopio, al ser satisfactorio el resultado se centrifugaron las células en un tubo cónico de 1.5 mL a 7,000 RPM, se eliminó el SN y se suspendió la pastilla celular en una solución acuosa de 2.5  $\mu\text{g } \text{mL}^{-1}$  calcoflúor blanco. Las células fueron fotografiadas con la cámara Scopel® acoplada al microscopio de fluorescencia UNICO®.

### 5.13 Cuantificación de trehalosa por HPLC.

La extracción de trehalosa se realizó según el protocolo descrito por Ferreira y cols, (1996), para ello las cepas de interés se cultivaron en MC líquido durante 18 h a 28°C en agitación constante a 150 RPM. Posterior a ello, los cultivos se concentraron por centrifugación a 3,000 RPM por 5 min. Se eliminó el SN y el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada estéril. Después 200 mL de MM pH7 (Tris-HCl pH 7, 30 mM), se inocularon con el volumen necesario de células ajustar la densidad óptica (DO) 600 nm a 0.02 unidades. El medio inoculado, se incubó por 15 h a 28°C con agitación constante (150 RPM), se agregó el agente estresante (2.5 mM peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se incubó con agitación durante 3 h en las mismas condiciones para finalizar a las 18 h. El control se mantuvo en las mismas condiciones de incubación (sin la adición de agente estresante). A continuación, se concentraron las células por centrifugación, la pastilla obtenida se congeló en nitrógeno líquido. Esta pastilla se molió hasta polvo fino en mortero y pistilo estéril, una vez molidas se pesaron directamente en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se adicionaron 30 mL de etanol grado HPLC. Las muestras se sometieron a un proceso de ebullición (baño maría) hasta la evaporación total del solvente. Ya que las muestras estuvieron secas se adicionó 1 mL de la mezcla de acetonitrilo:agua (50%:50%) ambos grado HPLC, para disolver la trehalosa presente en la muestra. La suspensión obtenida se recuperó en tubos nuevos. Previo a la cuantificación se recuperó a tubos y se centrifugó a 12,000 RPM por 10 min, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.2 µm de tamaño de poro. Las muestras se prepararon por duplicado. Para cuantificar la trehalosa se utilizó una columna Agilent Zorbax Carbohydrate 4.6 X 250 mm 5 µm con una precolumna aminada, la fase móvil fue de 75 % acetonitrilo 25 % agua y su flujo de 1.2 mL min<sup>-1</sup>, se utilizó el detector de índice refracción (IR) y el aparato de HPLC, Agilent® 1100 series. La curva de calibración se preparó con D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich®. Para hacer la curva de calibración se utilizaron las concentraciones de 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6 y 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, los datos se analizaron con el software PRICIM graphpath con una anova de dos vías y Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### **5.14 Crecimiento en trehalosa como única fuente de carbono.**

La habilidad de las cepas mutantes para utilizar la trehalosa como única fuente de carbono se analizó en MM pH 7, ajustado con 30 mM de Tris.HCl (Holliday, 1961), suplementado con trehalosa al 2 %. Para ello las cepas de interés previamente crecidas (18-24h en MC), se lavaron con agua destilada estéril dos veces y se determinó su DO a 600 nm. Posteriormente, el MM suplementado con la fuente de carbono se inoculó a la DO inicial de 0.005, los tubos se incubaron a 28 °C en agitación (150 RPM), a las 96 h se tomó una alícuota del medio y se diluyó (1:10,000) para sembrar 200 µL en una caja Petri con MM pH 7 glucosa 2 % (30 mM Tris.HCl), se incubaron a 28°C por 48 h, las colonias se contaron con el software libre openCFU®, el experimento se hizo por triplicado, se graficó por número calculado colonias vs la cepa en cuestión.

#### **5.15 Pruebas de estrés *in vitro*.**

Para las pruebas de estrés y uso de fuente de carbono se crecieron las cepas de interés en MC líquido durante 18-24 h a 28 °C. El número de células se determinó con la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , se prepararon diluciones decimales de cada una de las cepas y se inocularon 10 µL de cada dilución ( $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Una vez preparadas las diluciones, al tubo que contiene  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  se le trató con 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 3 h. Posteriormente se realizaron diluciones ( $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). De las diluciones así obtenidas, se inocularon gotas de 10 µl en MM pH 7 suplementado con el agente estresante. Los tipos de estrés analizados fueron estrés oxidativo, estrés de pared celular y estrés osmótico, los ensayos se realizaron por triplicado, de acuerdo a lo reportado por Cervantes-Chávez y cols. (2016). Las cajas se incubaron a 28 °C y el crecimiento fue monitoreado cada 24 h durante 120 h, las cajas se fotografiaron con la cámara Canon® EOS 600D.

#### **5.16 Secreción de polisacáridos al medio de cultivo.**

Se determinó la secreción de polisacáridos al medio de cultivo de las cepas crecidas en medio mínimo ajustado a pH 7 con tampón de citratos (30mM), para ello

se siguió el protocolo descrito por López Cabrera y cols 2016. Las cepas previamente crecidas en MC líquido durante 18-24 h en agitación constante de 150 RPM. Se midió la DO del cultivo a 600 nm, después se inoculó el volumen necesario de células para que la DO inicial fuera de 0.01 unidades en 50 mL de MM pH 7 con tampón de citratos. Los cultivos se incubaron durante 40 h a 28°C con agitación (150 RPM). Posteriormente por centrifugación se recuperó el SN y se conservó en un matraz Erlenmeyer, se agregaron 50 mL de etanol al 96% frío. Se mezcló e incubó a 4°C por 72 h. Una vez precipitado el polisacárido se recuperó con ayuda de una pipeta Pasteur y se procedió a secar la muestra en estufa a 80°C por 48 h, para posteriormente determinar el peso seco de la muestra. Se realizó por triplicado y se calculó la desviación estándar. Los datos fueron analizados con una ANOVA con post-test Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en el programa PRISM de GraphPad.

#### **5.17 Ensayo de ayuno.**

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Sánchez-Fresneda y cols., 2015, con las modificaciones pertinentes. Se crecieron las cepas en MC con el antifúngico de selección. Se incubó de 18-24 h en agitación constante de 150 RPM a una temperatura de 28°C, una vez transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de la suspensión celular para inocular en MC más 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de carbenicilina y se dejó incubar de 18-24 h en agitación constante de 150 RPM, a temperatura de 28°C. De este último cultivo se centrifugó a 5,000 RPM por 5 min y se desechó el SN, se ajustó el medio de cultivo a la DO de 0.9 para cada cepa. A una alícuota del stock se le trató con 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  por tres horas en agitación (150 RPM). A continuación, las cepas tratadas con peróxido y sin tratamiento se inocularon en 10 mL de agua destilada estéril a la concentración de D.O. 0.02 y se dejó incubar por 8 días a 28°C con agitación (150 RPM). Transcurrido el tiempo de incubación se prepararon diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , de cada una se inocularon 10  $\mu\text{L}$  por cepa en medio completo (MC) sólido. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h, éstas se fotografiaron con la cámara Canon® EOS 600D.

### **5.18 Ensayo de resistencia a ultracongelación.**

Se utilizó el protocolo descrito por Soto y cols (1999) con algunas modificaciones. Se ajustaron las células en la cámara de Neubauer a la concentración a  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , se prepararon diluciones a  $1 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , de esta suspensión celular se inocularon 200  $\mu\text{L}$  en una caja Petri con MM pH 7 (30 mM Tris.HCl, condición control). El tubo con la suspensión celular de  $1 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  se sumergió en nitrógeno líquido por 5 min. Posteriormente, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, ya que la suspensión celular se descongeló se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  y se inoculó directamente en una caja Petri con MM pH 7 (Tris.HCl 30 mM). Se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 48 h. Con el software libreCFU<sup>®</sup> (Geissmann., 2012) se contaron las colonias. Se calculó el porcentaje de sobrevivencia de las cepas de interés, se consideró la condición control como el 100 % de sobrevivencia. Se hicieron diluciones ( $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y tratamiento con nitrógeno líquido como se describió anteriormente. Para calcular el porcentaje de sobrevivencia a ultra congelación, cada experimento se realizó por triplicado y con base a los resultados se calculó la desviación estándar. Los datos fueron analizados con una ANOVA con post-test Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en el programa PRISM de GraphPad.

### **5.19 Pruebas de patogenicidad.**

La capacidad infectiva de las cepas mutantes se estudió en plantas de maíz de la variedad “cacahuazintle” de 8 a 12 días. Para preparar el inóculo se crecieron las cepas de interés en MC líquido durante 18-24 h en agitación constante a  $28^\circ\text{C}$  se colectaron las células y se contaron en la cámara de Neubauer. Se mezclaron  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de las cepas de sexo complementario (1:1) mutante x mutante, silvestre x silvestre y el control con agua destilada estéril. Se tomaron 300  $\mu\text{L}$  de la suspensión en cuestión y se inyectaron con una jeringa para insulina, en la base del tallo de las plantas de maíz. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron posterior a dos semanas de la inoculación, analizando el desarrollo en clorosis, deformación de las hojas, disminución de la talla y formación de tumores. Se asignaron cuatro valores de patogenicidad:

I: planta sana, II: clorosis o antocianinas, III: tumores pequeños, IV: tumores que doblen el tallo V: muerte de la planta de acuerdo a lo reportado por Chavan y cols. 2013. Los resultados se compararon con un test no paramétrico U de Mann-Whitney con una  $\alpha = 0.05$

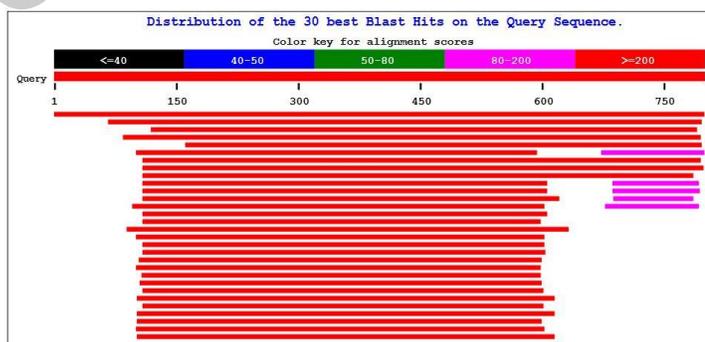
Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 6. Resultados.

### 6.1 Identificación del gen *Um ath1*.

El gen de la trehalasa ácida se identificó en la base de datos de *U. maydis* con el número *Um02212*. Para ello se utilizó la herramienta de BLAST y la secuencia de la trehalasa ácida de *S. cerevisiae* (*YPR026W*). El gen está ubicado en el cromosoma 5, en la región: 523559-521163 pb. Los genes vecinos de la trehalasa ácida son *Um02211* y *Um02213*. El gen *Um02211* consta de 1479 pb, que codifica a una proteína de 492 aa, peso molecular de 55.6 kDa, punto isoelectrico de 9.8504 y pertenece a una superfamilia de polinucleótido HAD cinasa 3 fosfatasa. El gen *Um02213* tiene 1745 pb, que codifica a una proteína de 581 aa, peso molecular de 61.9 kDa, punto isoelectrico 10.2635, es un transportador transmembranal de cromato. En el gen de nuestro interés, *Um02212*, la región codificante no está interrumpida con intrones y codifica una proteína de 798 aminoácidos con un peso molecular de 86.3 kDa, punto isoelectrico de 4.6, con posible secuencia de secreción. La trehalasa ácida pertenece a la familia O-glicosil hidrolasa (EC 3.2.1-), esta familia de enzimas son las encargadas en degradar el enlace glucosídico de los carbohidratos de dos o más azúcares, en esta familia existen 162 subfamilias y la trehalasa se encuentra en el grupo 65 glucósido hidrolasas (EC 3.2.1.28) que degradan exclusivamente a la trehalosa (Brumer y cols., 2018) Figura 4.

SIMAP similarity search  
UMAG\_02212 related to trehalase precursor



**Figura 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (BLAST).** Se muestra el resultado del alineamiento donde el programa indicó que el gen *UMAG\_02212* es un precursor de una trehalasa.

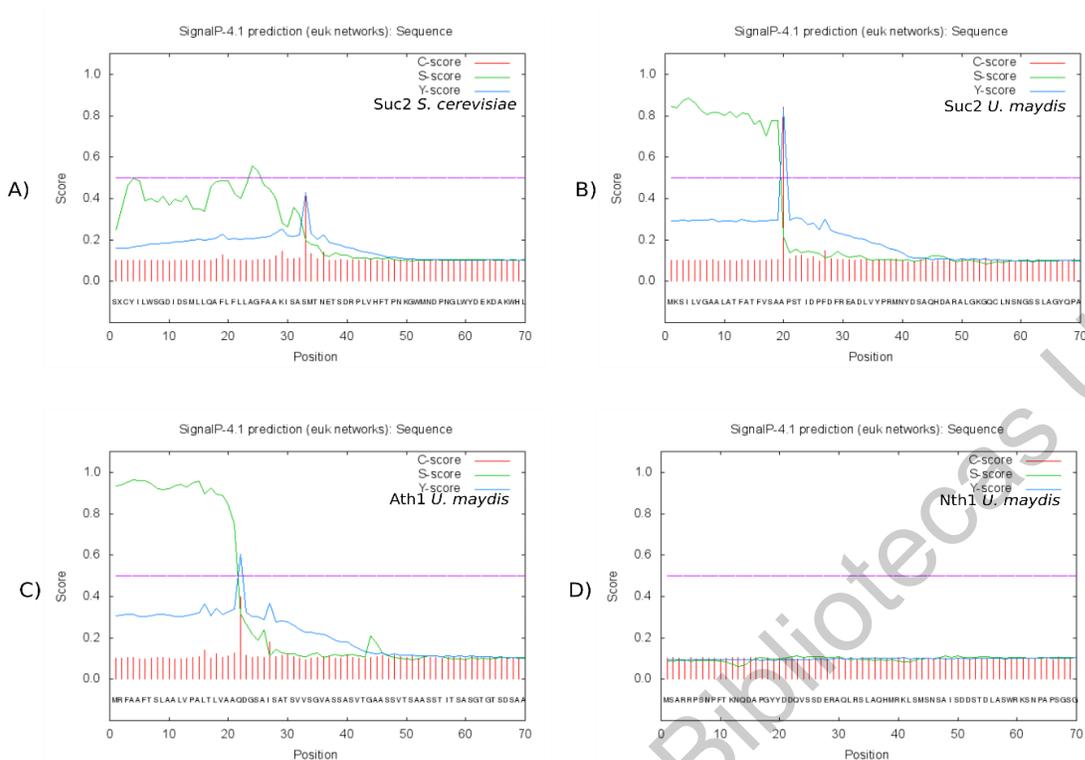
En *S. cerevisiae* se demostró que la trehalasa ácida se localiza mayormente en las vacuolas (He y cols., 2009), por esta razón se analizó la secuencia de

aminoácidos en el servidor signalP 4.1. El resultado obtenido se comparó con la invertasa (Suc2) de *S. cerevisiae* y de *U. maydis*, además con la trehalasas ácida y neutra de *U. maydis*. Los valores que arrojó el servidor se muestran en la Tabla 3 y Figura 5, cada proteína se analizó con los parámetros preestablecidos: C-score, S-score y Y-score. El C-score detecta péptidos con sitio de anclaje a la membrana en la proteína, y normalmente es de mayor magnitud justo antes del péptido señal. El S-score indica la presencia del péptido señal en la proteína madura. Mientras que el Y-score es el promedio geométrico que hay en el C y S-score predice con mayor precisión el sitio de anclaje de la proteína.

<b>Tabla 3. Predicción de péptido señal en proteínas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>U. maydis</i></b>				
Proteína	C-score	S-score	Y-score	Péptido señal/Posición
Suc2 <i>S. cerevisiae</i>	0.636	0.967	0.758	ISA-SM/ 19-20aa
Ath1 <i>S. cerevisiae</i>	0.432	0.914	0.513	VTA-LY/ 66-67aa
<i>Nth1 S. cerevisiae</i>	0.132	0.144	0.113	No definido
Suc2 <i>U. maydis</i>	0.842	0.829	0.842	VSA-AP/19-20aa
Ath1 <i>U. maydis</i>	0.399	0.9	0.606	VAA-QD/21-22aa
<i>Nth1 U. maydis</i>	0.108	0.114	0.107	No definido

aa: Péptido señal según el servidor signalP 4.1/3.0

Como lo marca la literatura sobre el signalP 4.1 pierde precisión al predecir el péptido señal en proteínas transmembranales como sucedió con la Ath1 de *S. cerevisiae*, por lo que se analizó con el servidor signalP 3.0 (Tabla 3). Los resultados cercanos al valor 0.1 se consideran que no son proteínas secretadas como lo fue para las trehalasas neutras tanto de *U. maydis* como de *S. cerevisiae*. En la figura 5 se muestra la gráfica que se obtuvo del servidor para las proteínas Suc2, Ath1 y *Nth1*, en la que se observa los valores para una secuencia que posee péptido señal, por lo cual estos datos sugieren que en *U. maydis*, la trehalasa ácida es secretada mientras que la trehalasa neutra no.

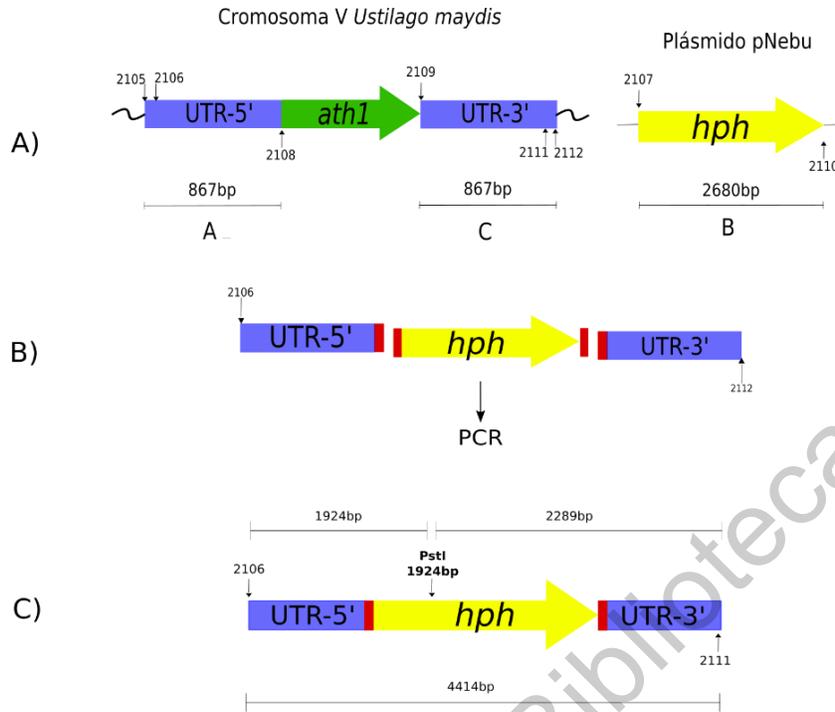


**Figura 5. Análisis predictivo de la secreción de las proteínas Ath1, Nth1 y Suc2.** Se utilizó como control positivo las secuencias de Suc2 de *U. maydis* y de *S. cerevisiae* paneles A) y B), para compararlo con los datos de la trehalasa ácida panel C) y la trehalasa neutra panel D) de *U. maydis*.

## 6.2 Estrategia para la delección del gen *ath1*.

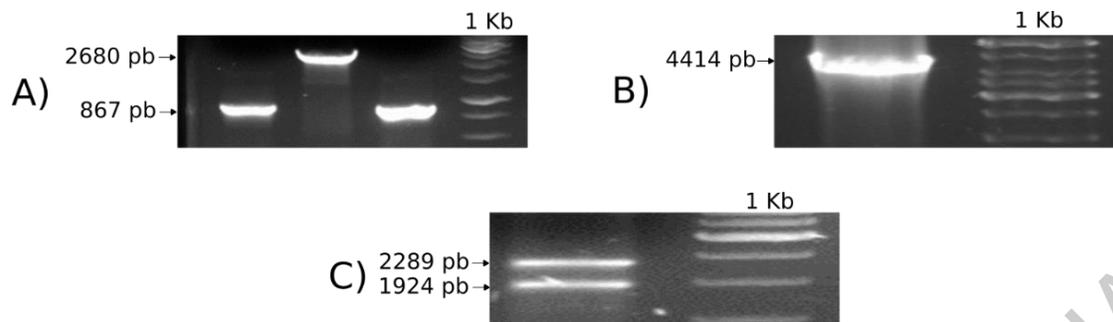
### 6.2.1 Construcción del cassette de interrupción del gen *ath1*.

La construcción del cassette para eliminar el gen *Um02212* (*ath1::hyg*) se realizó según lo establecido por Davidson y cols. (2012). La región no codificante 5'UTR (untranslated region) se amplificó con los oligonucleótidos 2105/2108 y el 3'UTR con los oligonucleótidos 2109/2112. Como ADN molde se utilizó el obtenido de la cepa FB2, se obtuvo la banda de 867 pb correspondiente para cada par de oligonucleótidos (Figura 6). Para el fragmento que corresponde al gen *hph* que codifica la Higromicina fosfotransferasa, se utilizaron los oligonucleótidos 2107/2110, a partir del plásmido pNebuH (Donado por la Dra. Regina Kahmann, Instituto Max Planck, Alemania) como ADN molde, se obtuvo una banda de 2680 pb (Figura 6).



**Figura 6. Representación esquemática de la construcción del cassette de interrupción *ath1::hyg*** A) Se muestra los oligonucleótidos utilizados para obtener el fragmento 5'UTR, 3'UTR del ADN genómico de *U. maydis* así como del gen *HPH* del plásmido pNebu H. B) Esquema de los tres fragmentos de ADN que conforman el cassette. En rojo se representa las secuencias que son complementarias presentes en los oligonucleótidos. C) Unión de los tres fragmentos por PCR y sitio de restricción para la enzima *PstI*, indicando el tamaño esperado de los fragmentos posterior a la digestión.

Una vez identificados los productos por peso molecular (Figura 7A), se purificaron con el kit QIAquick de Qiagen®. Se preparó una mezcla de los tres fragmentos en la siguiente relación 5'UTR: 226 ng, 3'UTR: 240 ng y gen *hph*: 532 ng. De la mezcla, se tomaron 2  $\mu$ L de ADN molde para el PCR de empalme, según lo descrito por Davidson y cols. (2012). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos 2105/2112 para unir los tres fragmentos y ensamblar el cassette de interrupción. Sin embargo, al observar el producto de amplificación y corroborar los pesos moleculares por electroforesis se obtuvieron dos bandas de amplificación (no mostrado). Por lo tanto, se utilizaron los oligonucleótidos anidados 2106/2111 esperando una banda de amplificación de 4414 pb (Figura 7C), el producto de PCR así obtenido se digirió con la enzima de restricción *PstI* confirmando así su identidad al obtener las bandas de los pesos esperados de 2289 pb y 1924 pb (Figura 7B).



**Figura 7. Construcción del cassette de interrupción *ath1::hyg*.** A) se muestra de izquierda a derecha el producto de PCR 5'UTR, *HPH* y 3'UTR. B) Amplificación por PCR del cassette de delección amplificado con los oligonucleótidos 2116/2111, C) Digestión del cassette de interrupción con la enzima de restricción *PstI*.

### 6.2.2 Clonación del cassette de interrupción para el gen *ath1*.

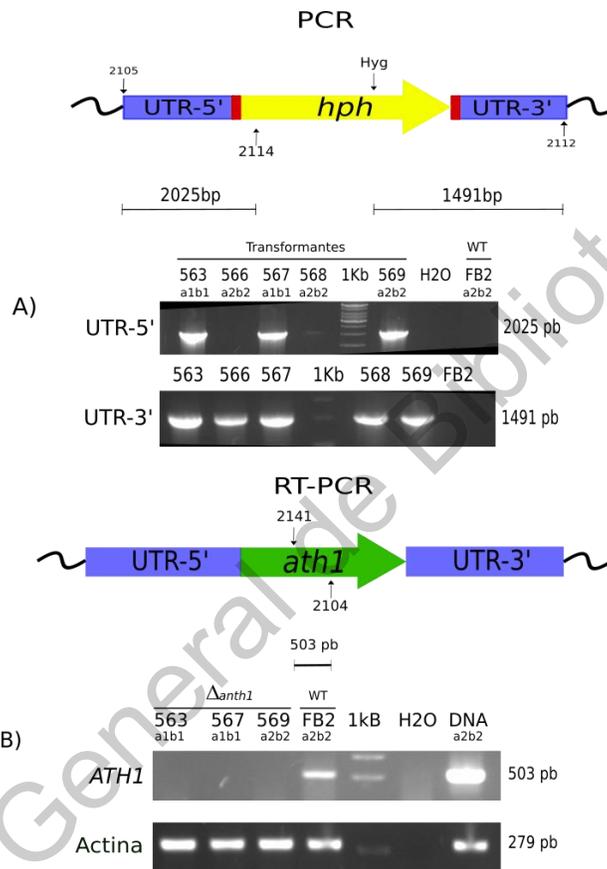
Se clonó el fragmento de 4414 pb que corresponde al cassette de interrupción *Ath1::Hyg* en el plásmido pCR2.1-TOPO, generando así el plásmido ALC#559. Se extrajo el plásmido y se corroboró su identidad por enzimas de restricción y por secuenciación del ADN (LANGEBIO, Irapuato).

### 6.2.3 Transformación de *Ustilago maydis* y selección de mutantes.

Para transformar a *U. maydis* se siguió el protocolo de Tsukuda y cols. (1988) descrito en la sección de metodología. Para ello, se amplificó el fragmento correspondiente al cassette de interrupción por PCR, con el par de oligonucleótidos 2111/2016 con la enzima de alta fidelidad y el plásmido ALC#559 como ADN molde, se obtuvo la banda de amplificación esperada de 4414 pb.

En la transformación utilizamos los controles indicados en el apartado 5.6.2, de estos eventos se recuperaron 36 colonias resistentes a Higromicina B. Se realizó un escrutinio por PCR con los oligonucleótidos 2112/Hyg (1491 pb) y 2105/2114 (2025 pb), con estos resultados de PCR se confirmó que la inserción del cassette de interrupción se integró por doble recombinación homóloga en el locus del gen *ath1*, reemplazando así el gen silvestre, mientras que el par de oligonucleótidos 2103/2104 amplificaron una banda (503 pb) correspondiente al ORF *ath1* para las cepas silvestres. Así mismo se comprobó la eliminación del ORF del gen *ath1* por RT-PCR, como control se amplificó un fragmento del gen de actina (2035/2036, 279

pb). En total, según el escrutinio realizado con las tres reacciones de PCR, se obtuvieron tres mutantes  $\Delta ath1$ , denominadas ALC#563 (a1b1), ALC#567 (a1b1) y ACL#569 (a2b2). A estas tres cepas se les extrajo el RNA para comprobar por RT-PCR, que no existiera transcrito de la trehalasa ácida con los oligonucleótidos (2104/2104, 503 pb), figura 8.

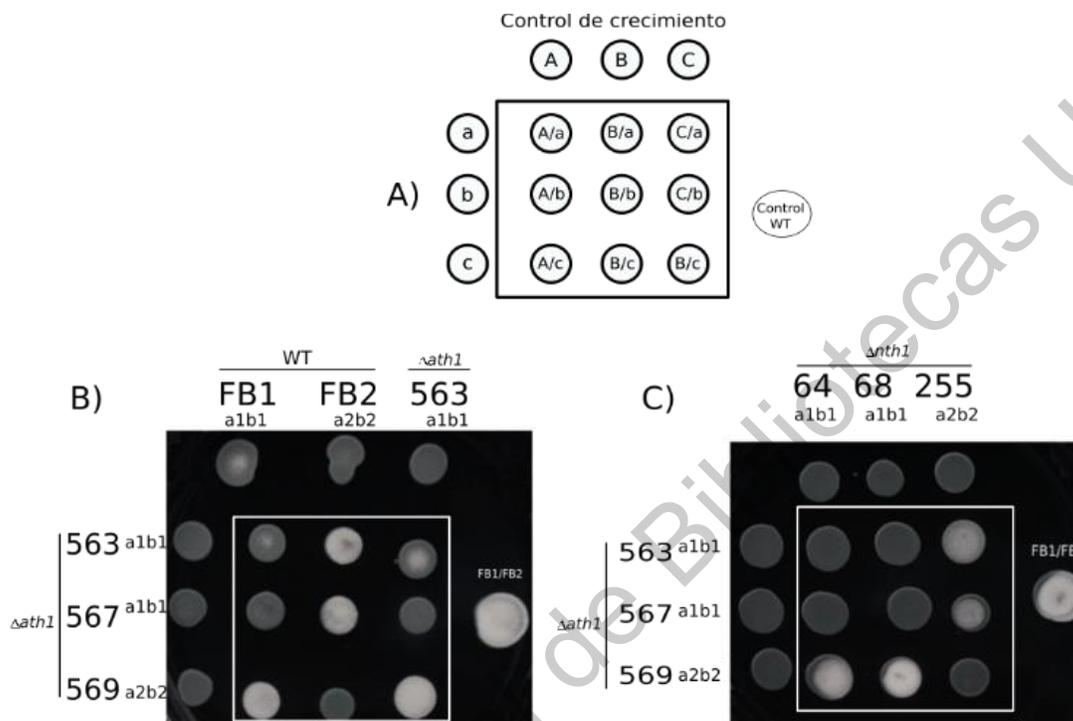


**Figura 8 Comprobación de mutantes  $\Delta ath1$  por PCR y RT-PCR.** A) Esquema de la correcta integración del cassette de delección. En la parte inferior se muestra el producto de PCR que confirma a las cepas 563, 567 y 569 como mutantes  $\Delta ath1$ . B) Comprobación de la delección del gen por RT-PCR se muestra el esquema del gen *ath1* señalando la ubicación de los oligonucleótidos 2103/2104 que amplifican un fragmento del ORF. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación que confirman a las mutantes  $\Delta ath1$ . Como control se amplificó el gen constitutivo de actina. Como control negativo no se incluyó ADN, como control positivo se utilizó ADN de la cepa silvestre FB2.

### 6.3 Obtención de dobles mutantes $\Delta ath1:: \Delta anth1$ .

Una vez confirmadas las mutantes  $\Delta ath1$ , se comprobó el sexo por reacción Fuz, para ello se realizó una cruce con la cepa del sexo opuesto, también se

determinó su capacidad para aparearse con la cepa  $\Delta nth1$  del sexo complementario. Para ello, se aparearon las cepas mutantes  $\Delta ath1$  X la cepa parental (WT), el par de cepas mutantes  $\Delta ath1$  X  $\Delta nth1$  y un control WT X WT (Figura 9).

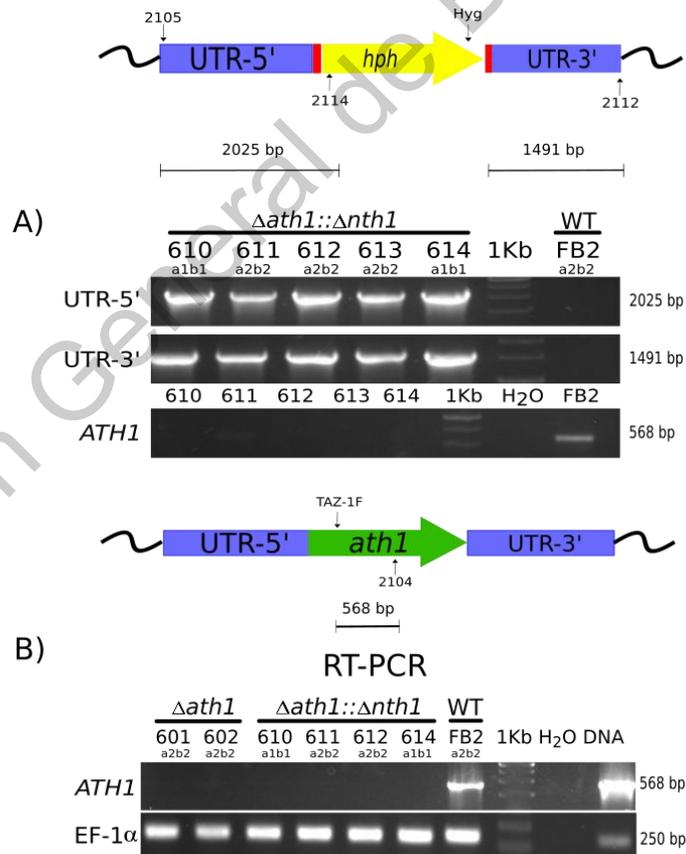


**Figura 9. Reacción Fuz de las mutantes  $\Delta ath1$  vs  $\Delta nth1$ .** A) Se muestra el patrón de inoculación y controles. B) Apareamiento entre las cepas  $\Delta ath1$  de sexo complementario C) Apareamiento entre cepas mutantes  $\Delta ath1$  X  $\Delta nth1$ .

Los resultados de la reacción Fuz, indican que las mutantes  $\Delta ath1$  se pueden aparear con las mutantes  $\Delta nth1$ , se seleccionaron las cepas mutantes ACL64 a1b1 ( $\Delta nth1$ ) y ACL569 a2b2 ( $\Delta ath1$ ) para inocular plantas de maíz y de la progenie recuperar las dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta ath1$  y las mutantes del sexo  $\Delta ath1$  a2b2. Una vez maduros los tumores (1 mes posterior a la inoculación) se extrajeron las teliosporas según el método reportado por Christensen y cols. (1963).

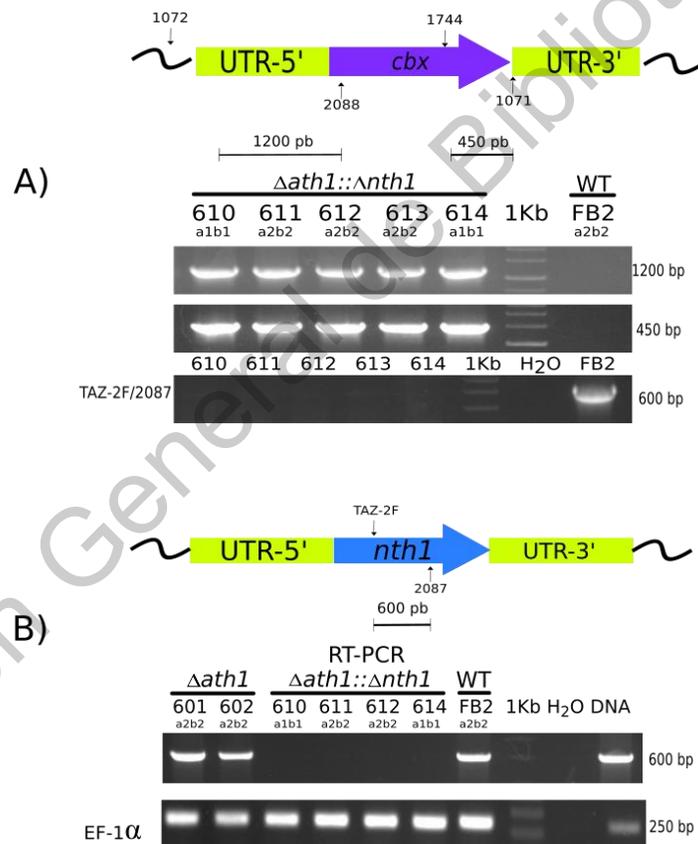
Una vez aisladas las teliosporas se hicieron diluciones y se dejaron germinar en MC con Higromicina B, carboxina y carboxina/Higromicina B. De cada caja se seleccionaron aquellas cepas que crecieron en Higromicina B para obtener mutantes  $\Delta ath1$  (Hyg<sup>R</sup>), así mismo se seleccionaron aquellas que crecieron en

ambos antifúngicos puesto que son las dobles mutantes. De las 150 cepas seleccionadas, 52 fueron resistentes a carboxina/Higromicina B, 32 resistentes a Higromicina B, 18 resistentes a carboxina y 48 cepas perecieron al ser silvestres. Las cepas de nuestro interés se cultivaron en MC más carbón activado para descartar a aquellas esporidias que fueran diploides. Sucesivamente se seleccionaron las cepas ya sea a1b1 o a2b2. Con base al marcador de selección (antifúngicos), se obtuvieron nueve cepas resistentes a  $cbx^R$  e  $hyg^R$  ( $\Delta ath1::\Delta nth1$ ), de las cuales cinco fueron del sexo a1b1 y cuatro del sexo a2b2. A estas nueve cepas se les extrajo el ADN para comprobar la inserción del cassette de delección por PCR con los oligonucleótidos 2105/2114 (2025 pb flanco 5'), y el par Hyg/2112 (1491 pb, flanco 3') para el gen *ath1*, además de que se comprobó la ausencia del transcrito por medio de RT-PCR con los oligonucleótidos TAZ1-F/TAZ1-R (568 pb) (Figura 10).



**Figura 10. Comprobación por PCR y RT-PCR de la mutación  $\Delta ath1$  en las dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$ .** En las cepas *cbx<sup>R</sup>* e *hyg<sup>R</sup>* se corroboró la correcta delección del gen *ath1*. A) Productos de PCR que comprueban la correcta inserción del cassette de interrupción *ath1::hyg*, UTR-5' (oligonucleótidos 2105/2114, 2025 pb), UTR 3' (oligonucleótidos Hyg/2112, 1491 pb) B) Se demuestra la ausencia del transcrito del gen *ath1* (oligonucleótidos TAZ-1F/2104, 568 pb) por RT-PCR. Como control se amplificó un fragmento del ORF factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$ , oligonucleótidos 2037/2038 (250 pb).

Posterior a comprobar la correcta mutación en el gen *nth1*, se procedió a comprobar la delección del gen *nth1* siguiendo la estrategia anterior. Con los oligonucleótidos TAZ-2 F/2087(600pb), 1072/2088(1200 pb), 1744/1071(450 pb), además de los ensayos de RT-PCR que comprobó la ausencia del transcrito del gen *nth1* (Figura 11).

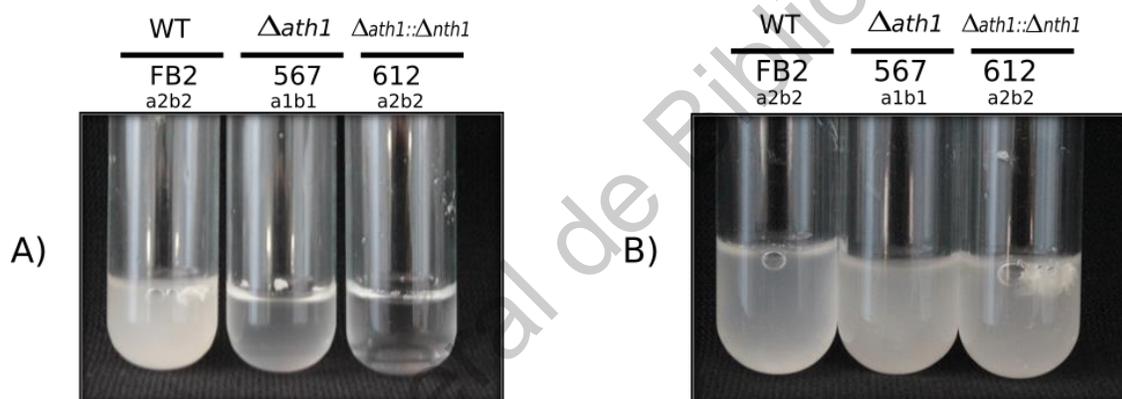


**Figura 11. Comprobación de la delección del gen *nth1* en las dobles mutantes  $\Delta nth1::\Delta ath1$ .** A) Con los oligonucleótidos 1072/2088 que amplifican 1200 pb del fragmento UTR-5' y 1744/1071 que amplifican 450 pb del fragmento UTR-3' se comprobó la inserción del cassette de interrupción con el gen de resistencia a carboxina. B) Ensayo de RT-PCR con los oligonucleótidos TAZ-2F/2087 que amplifican 600 pb del ORF *nth1*. Como control positivo se amplificó el factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  con los oligonucleótidos 2037/2038 (250 pb)

## 6.4 Caracterización fenotípica de las cepas $\Delta ath1$ , $\Delta ath1::\Delta nth1$ .

### 6.4.1 Crecimiento en MM suplementado con trehalosa.

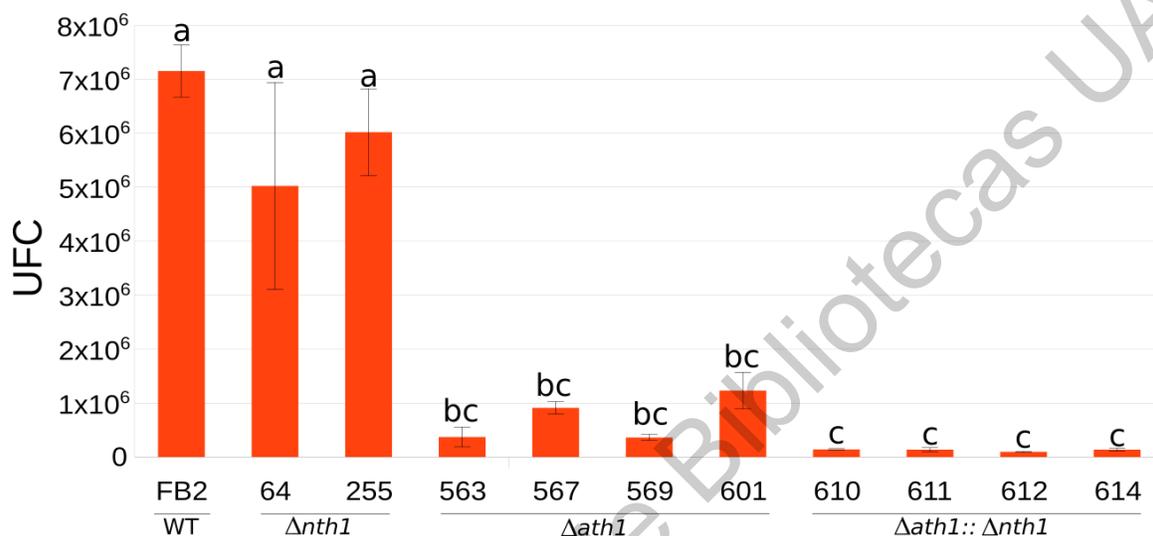
Se crecieron las cepas mutantes en MM pH 7 suplementado con trehalosa como única fuente de carbono (2 %), como control se comparó el crecimiento obtenido en glucosa al 2 %. En la figura 12 se observan los resultados cualitativos, donde se logra observar turbidez en la cepa WT, sin embargo las cepas  $\Delta ath1$  hay menor turbidez en comparación a el tubo de ensaye de la cepa parental, para las cepas dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$  el medio de cultivo quedó transparente sugiriendo el no crecimiento del hongo.



**Figura 12. Crecimiento en trehalosa como única fuente de carbono.** A) MM pH 7 con 2% de trehalosa B) MM pH 7 con glucosa 2 %. Las cepas se incubaron a 28°C en agitación durante 48 h.

Después de obtener los resultados cualitativos, se realizaron diluciones de los cultivos y se sembraron en cajas Petri con MM pH 7 suplementado con glucosa, para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) y obtener así un resultado cuantitativo (Figura 13). Con este experimento se demostró que las cepas  $\Delta ath1::\Delta nth1$  fueron incapaces de metabolizar y crecer en trehalosa como única fuente de carbono, puesto que no fue posible observar crecimiento, mientras que las mutantes  $\Delta ath1$  registraron un conteo en el orden de  $1 \times 10^6$  UFC. Sin embargo, las mutantes  $\Delta nth1$  crecieron a la par con la cepa parental FB2, puesto que mostraron un crecimiento de  $\pm 6 \times 10^6$  UFC (Figura 13). Estos datos indican que la función de la trehalasa neutra es metabolizar la trehalosa intracelular, mientras

que la trehalasa ácida, se encarga de metabolizar la trehalosa extracelular. Surgiendo la pregunta de la participación de un transportador funcional de trehalosa en este hongo, que sería el encargado de internalizar el disacárido para posteriormente llevar a cabo su hidrólisis por Nth1.

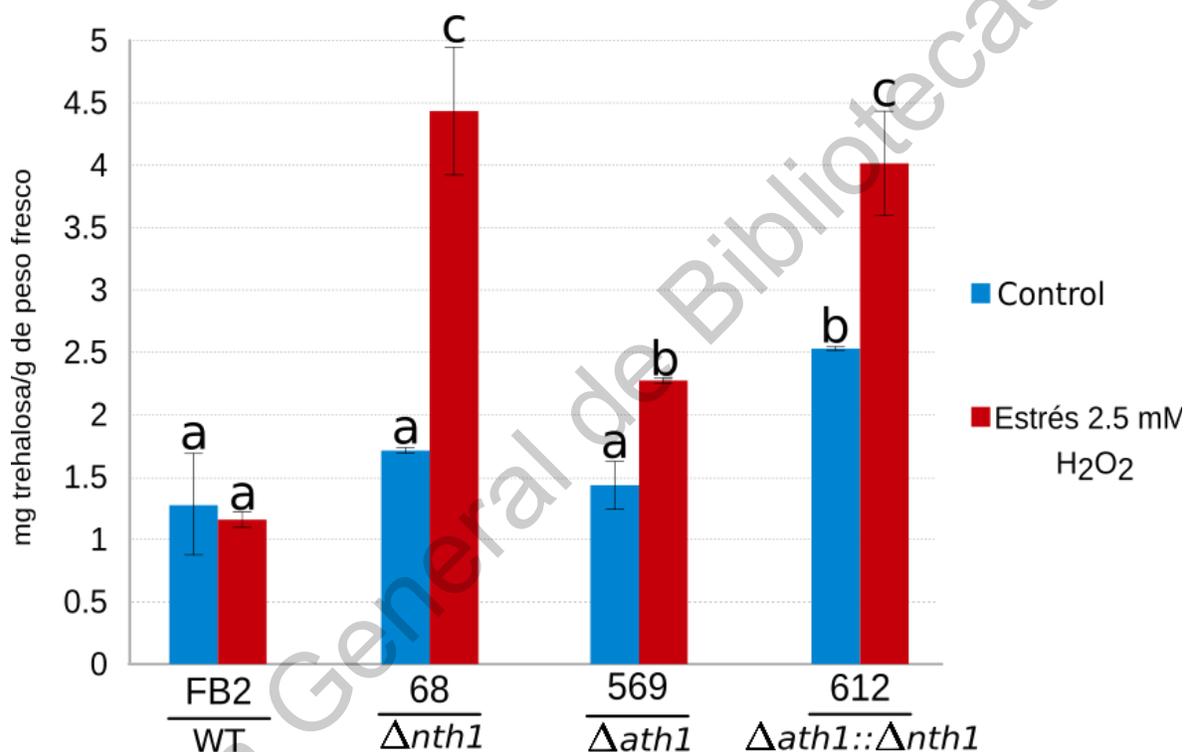


**Figura 13. Unidades formadoras de colonia obtenidas posterior al crecimiento en trehalosa durante 48 h.** Se muestra las UFC obtenidas para cada cepa representando la viabilidad de cada una después de haber crecido en MM pH 7 con trehalosa como única fuente de carbono durante 2 días. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas del experimento. Los datos fueron analizados con el software graphPad PRISM por ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ )

#### 6.4.2 Cuantificación de trehalosa.

Considerando la participación de estas enzimas en la degradación de trehalosa, procedimos a cuantificar este disacárido en condiciones estándar de crecimiento, así como posterior a un tratamiento con estrés oxidativo suave, utilizando para ello 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante tres horas, esto con la finalidad de determinar si este tratamiento es capaz de inducir la síntesis y acumular trehalosa. Observamos que la concentración de trehalosa fue de mayor a menor en el siguiente orden respecto al genotipo:  $\Delta nth1 > \Delta ath1::\Delta nth1 > \Delta ath1 > WT$  en crecimiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, la concentración de trehalosa más alta en condiciones control fue para la cepa doble mutante  $\Delta ath1::\Delta nth1$  cerca de los 2.5

mg de trehalosa por g de peso fresco, seguido de las mutantes  $\Delta nth1$  con una concentración cercana a los 1.5 mg de trehalosa por g de peso fresco, mientras que la mutante de la trehalasa ácida acumuló menos de 1.5 mg de trehalosa (Figura 14). Estos resultados demuestran que las mutantes de *U. maydis* son capaces de acumular mayor cantidad de trehalosa en condiciones del estrés oxidativo suave que como una respuesta a una situación adversa, así mismo se relaciona con el mecanismo de degradación llevado a cabo por Nth1 y Ath1.

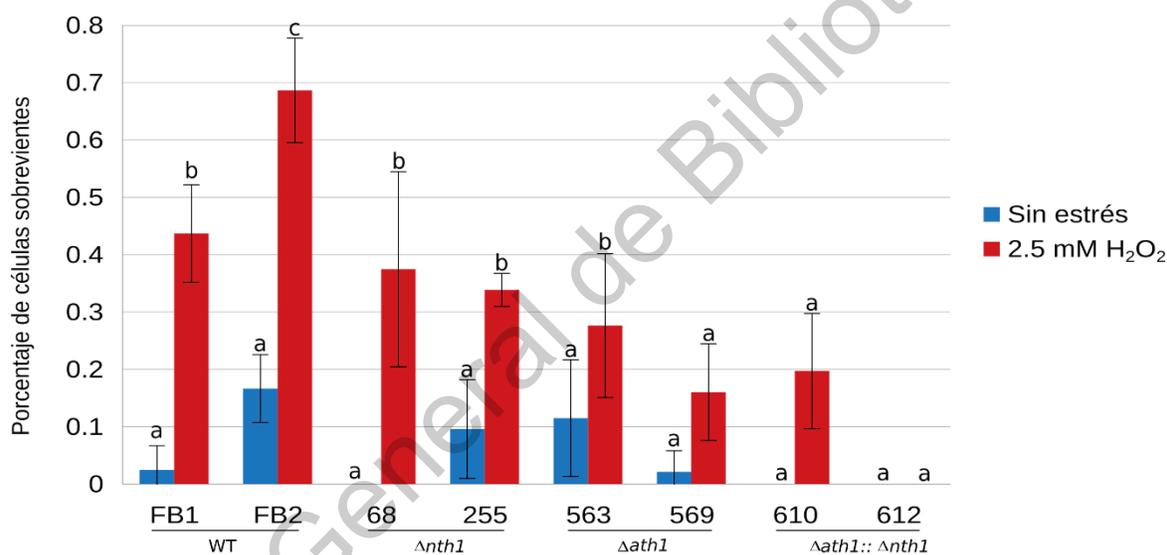


**Figura 14. Concentración intracelular de trehalosa.** En el eje Y se muestra la concentración de trehalosa en mg/g por peso fresco de células. Las cepas se crecieron en MM pH 7 y se administró o no un estrés oxidativo suave durante tres horas. Los datos se analizaron con el software graphPad PRISM por ANOVA de dos vías, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 6.4.3 Respuesta a la ultracongelación de *Ustilago maydis*.

En levadura se ha asociado que al aumentar la concentración de trehalosa, aumenta la tolerancia a temperaturas bajas (Feofilova y cols., 2014; Soto y cols., 1999). Se sugiere que la trehalosa logra “encapsular” el agua evitando la formación de cristales de gran tamaño que perforan la membrana celular. Por ello se analizó la capacidad de las cepas que acumulan más trehalosa para tolerar el frío

exponiéndolas a ultracongelación con nitrógeno líquido durante cinco minutos, posteriormente se midió el porcentaje de células viables, que por lo tanto son capaces de crecer en MM pH 7. Nuestros datos demuestran que las cepas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son más resistentes a la congelación con nitrógeno líquido al mostrar un mayor porcentaje de sobrevivencia (Figura 15), este resultado se obtuvo en toda la colección de cepas, con excepción de la cepa 612 ( $\Delta ath1::\Delta nth1$ ) que fue más lábil a la ultracongelación en las dos condiciones probadas, al no formar colonias, con nuestros resultados comprobamos que es más determinante la concentración de trehalosa y degradación en *U. maydis*, ya que las cepas WT,  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1$  lograron tener más células viables en comparación a las dobles mutantes ( $\Delta ath1::\Delta nth1$ ).

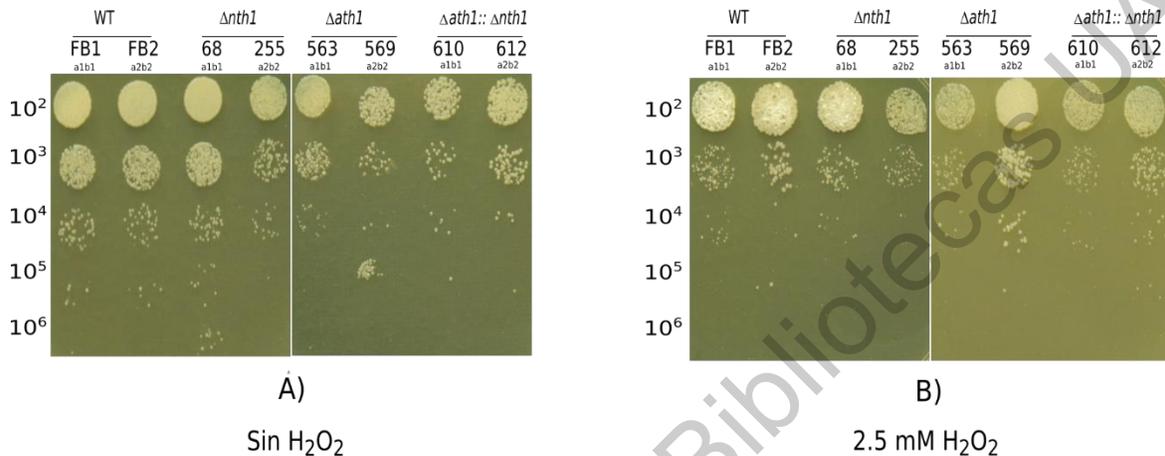


**Figura 15. Resistencia a ultracongelación en *U. maydis*.** Las cepas se ajustaron a la 1X10<sup>8</sup> células/ml se congelaron en nitrógeno líquido, el porcentaje de sobrevivencia se calculó contando las colonias en MM pH7 obtenidas antes y después de congelar las células. Las barras rojas, tratamiento con 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las barras azules sin tratamiento. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con el software graphPad PRISM con ANOVA de dos vía, Tukey (p≤0.05).

#### 6.4.4 Tolerancia al ayuno.

Estudiamos el comportamiento de las cepas mutantes en condiciones de ayuno, al someterlas por 8 días en agua destilada estéril según lo descrito por Sánchez-Fresneda y cols., (2015) con las modificaciones comentadas en el apartado 5.19. Con este ensayo determinamos si la trehalosa funge como protector

o es utilizada como fuente de carbono por la célula. El resultado mostró que en ausencia de nutrientes la colección de cepas logró crecer sin problema (Figura 16), aunque vemos un crecimiento menor en las cepas  $\Delta ath1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  a partir de las diluciones  $10^5$ , las cepas se comportaron de esta misma manera al ser tratadas con 2.5 mM  $H_2O_2$  por tres horas e incubarlas en agua destilada estéril por ocho días.

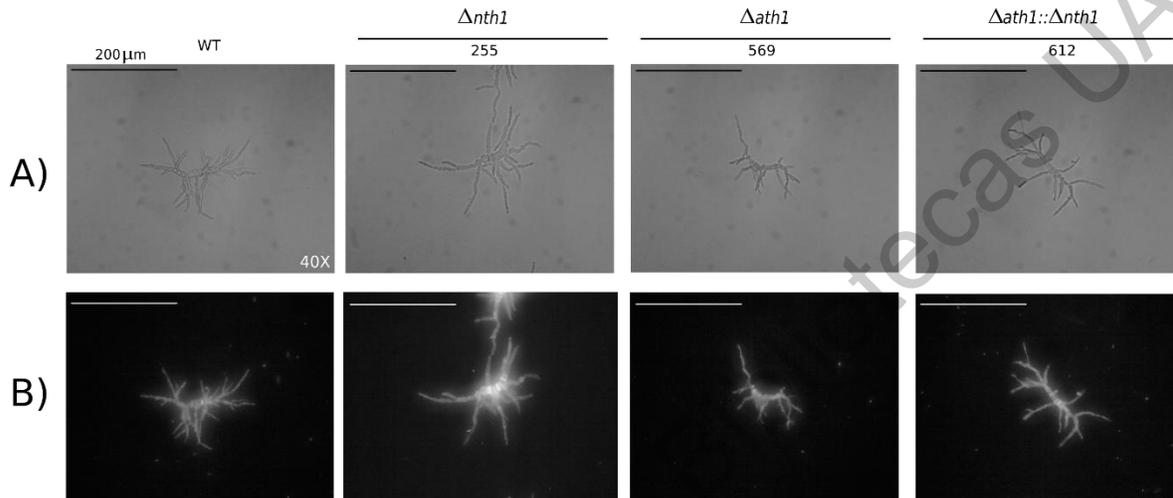


**Figura 16. UFC recuperadas posterior al ayuno extremo en agua por 8 días.** Las cepas se sembraron en MC sólido después del ayuno de ocho días en agua destilada. A) Cepas en ayuno, B) Cepas en ayuno tratadas con 2.5 mM  $H_2O_2$  por 3 h.

#### 6.4.5 Crecimiento en forma de hifa.

Un evento indispensable en *U. maydis* para infectar el maíz, es la capacidad de crecer en forma de hifa. Para ello se determinó si la ausencia de los genes *ath1*, y *nth1* de manera independiente o en conjunto, podrían influir en la capacidad de llevar a cabo la transición dimórfica de levadura a hifa en respuesta al pH ácido del medio de cultivo (MM pH 3). Además, este ensayo nos permite identificar si hay diferencias en la pared celular una vez que las células sean teñidas con calcoflúor blanco. Los resultados demuestran que la formación de hifas fue con normalidad en toda la colección de cepas; sin embargo, se observó que los septos tuvieron una distribución diferente comparándolas con las cepas parentales, en especial las mutantes  $\Delta nth1$ , ya que la distribución de los septos en estas cepas fue atípica comparándola con el control silvestre FB2, dado que son más gruesos y más brillantes (Figura 17). Para la cepa  $\Delta ath1$  observamos un patrón diferente a la WT pero con septos no tan gruesos como fue el caso de las cepas  $\Delta nth1$  y a su vez la

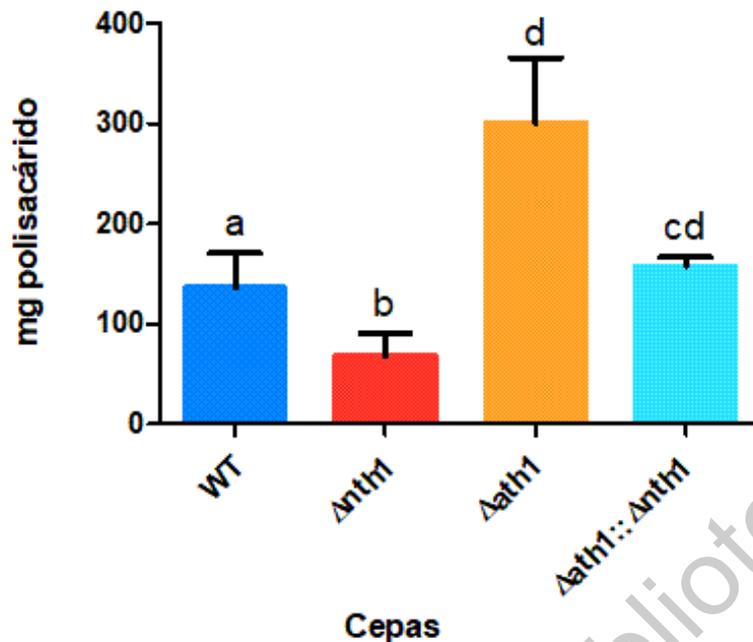
mutante  $\Delta ath1::\Delta nth1$  muestra resultados semejantes a los de la cepa  $\Delta ath1$  sin septos tan gruesos pero distribución diferente a la cepa parental FB2. Este experimento sugiere que las trehalasas pueden estar relacionadas con la deposición de quitina y distribución de septos en *U. maydis* (Fonseca-García y cols., 2011; Aréchiga-Carvajal y cols., 2005).



**Figura 17. Crecimiento de hifa de las cepas WT y mutantes  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$ .** A) Se muestran las imágenes con microscopía de interferencia diferencial, cepas silvestres, mutantes  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$ . B) Imágenes de microscopía de fluorescencia, células teñidas con calcoflúor blanco, Objetivo 40X.

#### 6.4.6 Secreción de polisacárido.

La secreción de polisacáridos al medio de cultivo por parte de *U. maydis*, indica de manera indirecta posibles cambios en la arquitectura de la pared celular del hongo. Para este experimento utilizamos el MM pH 7 con el tampón de citratos. En la figura 18 se observó mayor producción de polisacárido por parte de las cepas  $\Delta ath1$ , al registrar 400 mg en promedio de polisacárido para la cepa 569 y 200 mg para su contra parte sexualmente compatible 563. Por otro lado las cepas  $\Delta nth1$  fueron las cepas que menor producción de polisacárido registraron en promedio, las cepas 68 y 255 registraron valores similares cercanos a los 100 mg, las dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$  reportaron valores semejantes a las cepas parentales WT con valores que oscilan en los 150 mg.



**Figura 18. Polisacáridos secretados al medio de cultivo por las cepas  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$ .** El polisacárido secretado al medio de cultivo se precipitó con etanol 50 %, cada barra representa el promedio de tres réplicas, las barras de error representan la desviación estándar, los datos fueron analizados con el software graphPad PRISM por ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

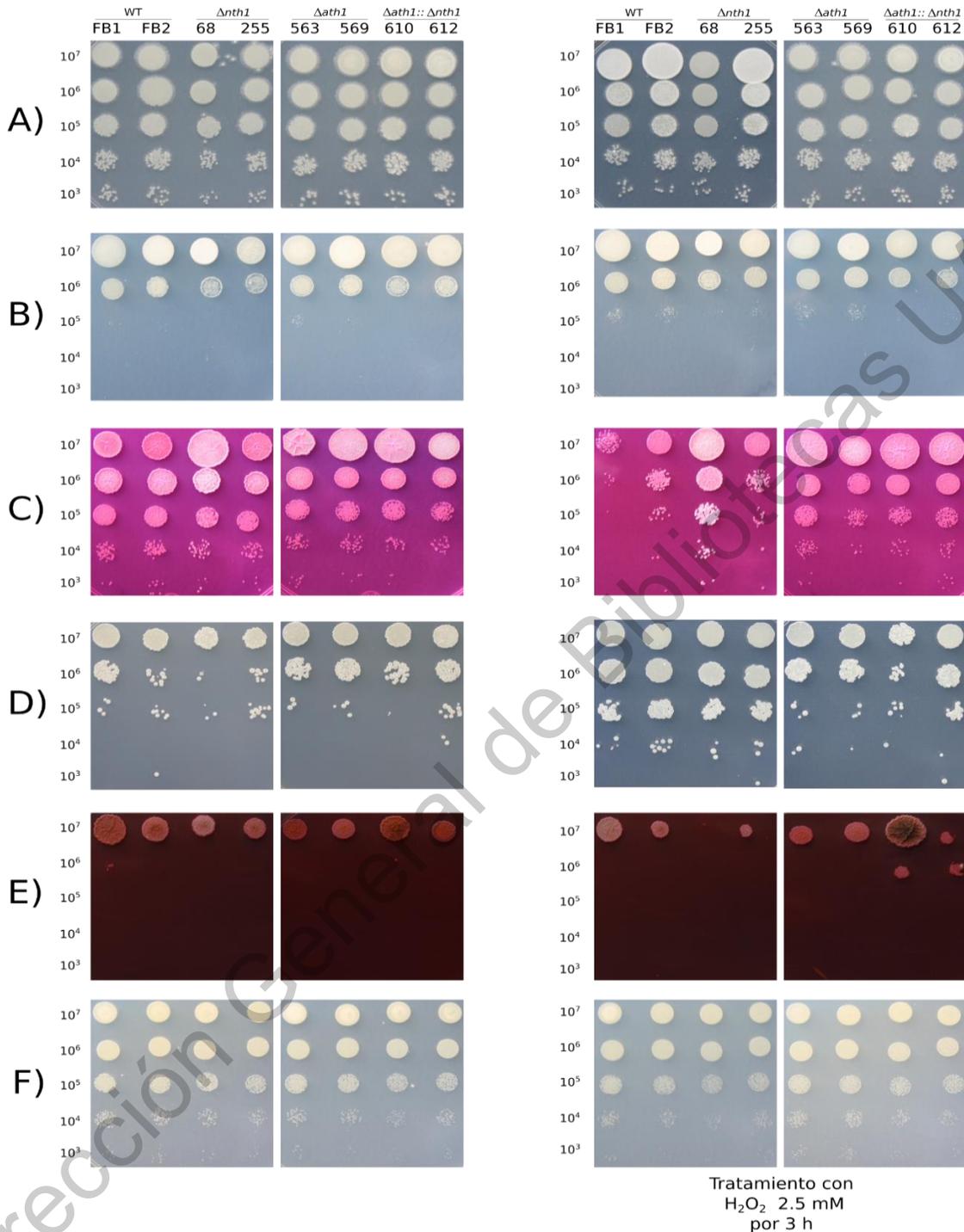
#### 6.4.7 Ensayos de estrés.

Se analizó la respuesta a algunos agentes estresantes para determinar la importancia de la trehalosa en respuesta a: estrés osmótico, de pared celular, oxidativo, pH ácido. Al igual que en experimentos previos se trató a las cepas con 2.5 mM  $H_2O_2$  por tres horas con la finalidad de inducir la síntesis de trehalosa y por lo tanto incrementar su concentración intracelular (Figura 19).

Para el caso específico de estrés oxidativo obtuvimos resultados interesantes en menadiona y rosa de bengala. En presencia de menadiona a la concentración de 70  $\mu M$  el crecimiento fue muy similar para todas las cepas sin el tratamiento de  $H_2O_2$  sin embargo, en el tratamiento previo con  $H_2O_2$  se observó mayor crecimiento, donde las cepas en la dilución  $1 \times 10^5$  crecieron, en contraste a las cepas sin el tratamiento, puesto que crecieron solamente hasta la dilución  $1 \times 10^4$ . Para comprobar si había algún cambio con otro agente oxidativo utilizamos el rosa de

bengala a la concentración de 90 µg/mL en condiciones de luz, el resultado que dieron las cepas sin el tratamiento previo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 2.5 mM fue un crecimiento similar en todas las cepas hasta la dilución 1x10<sup>3</sup>, sin embargo las células con el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraron diferencia en las cepas FB1 y FB2 (WT) donde crecieron hasta la dilución 1x10<sup>6</sup> y 1x10<sup>5</sup>, sin embargo para el resto de las cepas mutantes *Δnth1*, *Δath1* y *Δath1::Δnth1*, crecieron hasta la dilución 1x10<sup>3</sup>. Cabe mencionar que también se hicieron otros ensayos con otros agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno, tert-butil-hidroperóxido donde todas las cepas crecieron de igual manera tanto con el tratamiento previo de peróxido y sin el tratamiento (datos no mostrados). Otro resultado destacado fue el crecimiento de las cepas que se expusieron a radiación ultravioleta de 40,000 µJ/cm<sup>2</sup>, el crecimiento de las cepas fue hasta la dilución 1x10<sup>5</sup>, mientras que al tratar las células con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM crecieron hasta la dilución de 1x10<sup>4</sup>, sin embargo las cepas *Δath1* y *Δath1::Δnth1* hubo un crecimiento ligeramente menor.

Utilizamos el rojo congo como agente estresante de la pared celular. A la concentración de 36 µg/ mL el crecimiento de las cepas que no fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue muy similar, sin tomar en cuenta la cepa parental FB1 donde en la dilución de 1x10<sup>6</sup> creció pobremente. Sin embargo el crecimiento cambió al tratar las cepas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, especialmente en las cepas *Δath1::Δnth1* donde lograron crecer en la dilución 1x10<sup>6</sup>, sin embargo para la dilución de mayor concentración (1x10<sup>7</sup>) las cepas *Δnth1* crecieron con dificultad en comparación a las WT, cabe resaltar que las cepas *Δath1* crecieron un poco más que las cepas parentales. Otros agentes estresantes en los que se obtuvieron resultados muy similares fueron: ácido acético, SDS 0.004 %, NaCl 1.1 y 0.8 M, KCl 1 M, sorbitol 1 M. Para concluir las cepas al crecer a 0.5% y 0.45% de ácido acético perecieron sin embargo a la concentración de 0.15% hubo una diferencia en las cepas tratadas con peróxido de hidrógeno donde en la dilución 1x10<sup>3</sup> registro un número mayor de colonias en comparación a las cepas no tratadas.



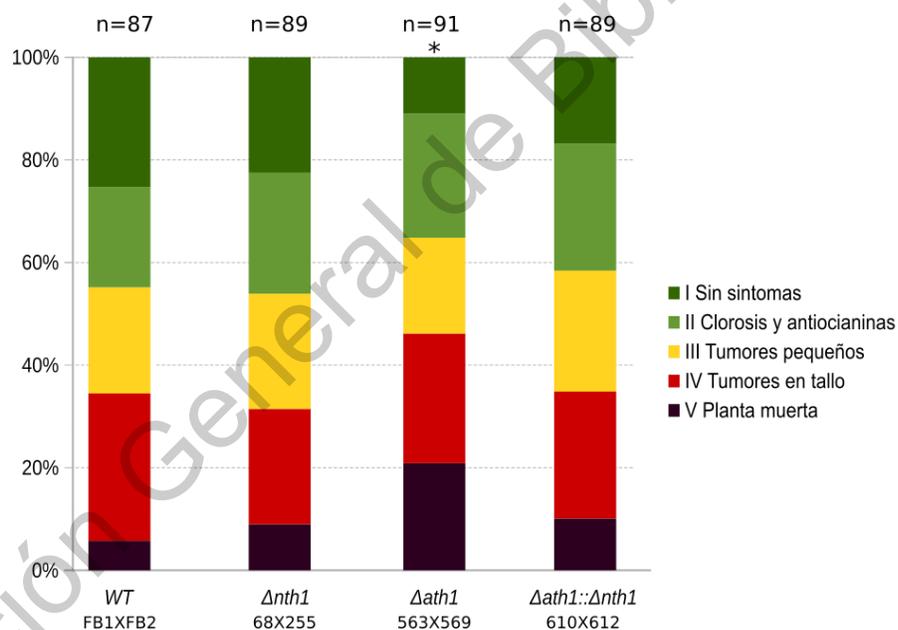
**Figura 19. Respuesta a condiciones de estrés. Se inocularon las cepas en MM pH 7 con la concentración indicada para cada estrés. A) Control, B) UV 40, 000  $\mu\text{J}/\text{cm}$  C) Rosa de bengala 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , D) Menadiona 70  $\mu\text{M}$ , E) Rojo congo 36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , F) Ácido acético 0.015%. Las cajas se incubaron a 28°C por 72 h.**

#### 6.4.8 Ensayos de patogenicidad.

Para comprobar la importancia de los genes *ath1* y *nth1* en la capacidad del hongo para producir enfermedad, se realizaron las pruebas de patogenicidad en

plantas de maíz de la variedad cacahuazintle. Los síntomas se analizaron a los 14 días post-inoculación. Las mezclas utilizadas fueron las siguientes: FB1XFB2 (WT) control, 68X255 ( $\Delta nth1$ ), 563X569 ( $\Delta ath1$ ) y 610X612 ( $\Delta ath1::\Delta nth1$ ).

Según los análisis estadísticos las cepas  $\Delta ath1$  fueron las que lograron una diferencia significativa con una  $p=0.009$ , por lo que fueron más exitosas en generar síntomas a las plantas. Los resultados obtenidos indican que entre las cruza de las cepas WT,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  se comportaron muy similar. Los datos recabados se analizaron con el test no paramétrico U de Mann-Whithnney para determinar estadísticamente las diferencias en síntomas comparado con el control parental (Figura 20). Para cada par de cepas se representa el porcentaje de plantas con los síntomas I, II, III, IV, V (ver apartado 5.21).



**Figura 20. Pruebas de patogenicidad en plantas de maíz de la variedad cacahuazintle.** Las plantas de 10 días de edad fueron inoculadas con las mezclas de cepas indicadas en la abscisa. FB1XFB2 (WT) control, 68X255 ( $\Delta nth1$ ), 563X569 ( $\Delta nth1$ ) y 610X612 ( $\Delta ath1::\Delta nth1$ ). En el eje de la ordenada se indica los porcentajes de los síntomas presentados por las plantas. En la parte superior de las barras se indica el número de plantas infectadas, los signos de la enfermedad fueron tomados a los 14 días posteriores a la inoculación. \*Diferencia significativa  $p<0.05$  U-test.

## 7 Discusión.

### 7.1 Identificación de trehalasas en *Ustilago maydis*.

En relación a las trehalasas presentes en *U. maydis*, determinamos que cuenta con solo dos, corroborando así los datos obtenidos en la base de datos del genoma de este hongo, puesto que el análisis BLAST realizado con el gen de la trehalasa ácida de *S. cerevisiae* (YPR026W) mostró un hit elevado con el gen *Um02212*. Mientras que la trehalasa neutra (*Um11661*) fue previamente descrita por nuestro grupo de trabajo (López-Cabrera, 2016).

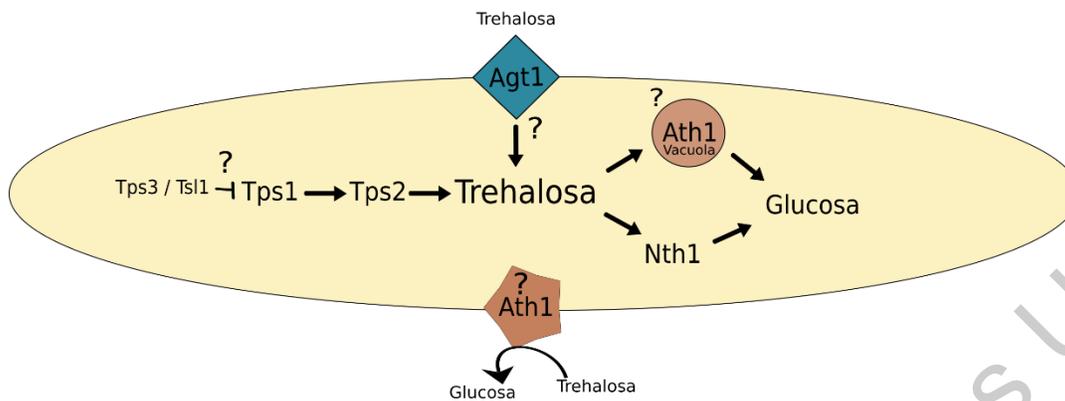
El escenario en *U. maydis* se asemeja a lo previamente reportado en *C. parapsilosis*, *C. albicans*, o *A. niger*, donde solo hay una trehalasa neutra y una ácida (Sánchez-Fresneda y cols 2014, Sánchez-Fresneda y cols. 2015, Pedreño y cols., 2007, Svanström y cols. 2012). De forma similar, está el caso del fitopatógeno *B. cinerea*, sin embargo, en este caso la enzima Tre1 no es una trehalasa ni ácida ni neutra, sino una fusión de ambas (Doehlemann y cols., 2006). En contraste a nuestros resultados tenemos el caso de los ascomicetos *S. cerevisiae* y *Neurospora crassa*, ya que sus genomas codifican tres trehalasas, dos neutras y una ácida (Eleutherio y cols., 2014 d'Enfert y cols., 1999).

El sustento para afirmar que *U. maydis* solo posee dos trehalasas se observó con las cepas dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$ , las cuales fueron incapaces de crecer en MM pH 7 suplementado con trehalosa como única fuente de carbono. Puesto que las UFC obtenidas fue: WT> $\Delta nth1$ > $\Delta ath1$ > $\Delta ath1::\Delta nth1$  (Figuras 13 y 14). Lo observado en las mutantes  $\Delta nth1$  coincide con lo previamente descrito para *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis* y *C. albicans* (Sánchez-Fresneda y cols., 2015; Eleutherio y cols., 2014; Pedreño y cols., 2007). Sin embargo, las mutantes  $\Delta ath1$  de *U. maydis* hubo crecimiento (Figuras 13 y 14), a diferencia de *C. parapsilosis* y *C. albicans*, este resultado puede deberse a la función de el transportador de trehalosa *Agt1*, y por este medio tal vez la trehalosa esté ingresando a la célula y degradada por la trehalasa *Nth1*. Será interesante estudiar la mutante  $\Delta agt1$  para confirmar la actividad del transportador *Agt1* que en la base de datos del genoma de *U. maydis* está identificado como el gen *Um05972*.

Los resultados del servidor signalP, demostraron que probablemente la trehalasa ácida posee un péptido señal en los aminoácidos 19-20, este dato sugiere que la localización celular de la trehalasa ácida es la pared celular, las vacuolas o en su defecto sea secretada al medio de cultivo. Similar a lo descrito en *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis* o *C. albicans* (He y cols., 2009; Sánchez-Fresneda y cols., 2014; Pedreño y cols., 2007) y de manera específica en el caso de *S. cerevisiae*, la trehalasa ácida fue marcada con la proteína verde fluorescente y se determinó que se localiza en vacuola y membrana (He y cols., 2009).

Con la colección de cepas mutantes de las trehalasas se demostró que estos genes no son esenciales para el hongo, ya que fue posible obtener las mutantes en los medios selectivos, ya fuera *in vitro* o *in planta*, estos resultados concuerdan con los demás organismos modelo, *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *B. cinerea*, *M. acridium*, *M. grisea* (Jin y cols., 2015; Sánchez-Fresneda y cols., 2015; Sánchez-Fresneda y cols., 2014; Garre y Matallana., 2009; Doehlemann y cols., 2006; Foster y cols., 2003; Pedreño y cols., 2002).

Con base en nuestros resultados proponemos el esquema del metabolismo de la trehalosa figura 21, integramos los genes putativos localizados en el genoma de *U. maydis*, *tps3* (Um02390), *ts1* (Um03935), *agt1* (Um05972), las primeras dos han demostrado que son reguladores de la Tps1 y de la pared celular en *S. cerevisiae* (Thammahog y cols., 2017; Eleutherio y cols 2015), mientras que para *atg1* es un transportador de trehalosa.



**Figura 21. Esquema propuesto del metabolismo de la trehalosa en *U. maydis*.** Las proteínas Tps3/Tsl1 regulan a Tps1. El transportador Agt1 tiene la capacidad de internalizar la trehalosa al citosol, posible localización de la trehalasa ácida en las vacuolas y/o pared, mientras que la trehalasa Nth1 se le localiza en el citosol.

## 7.2 Acumulación de trehalosa en *U. maydis*.

Los datos de la concentración intracelular de trehalosa, concuerdan con que las trehalasas Ath1 y Nth1 son las principales enzimas que degradan la trehalosa, ya que las cepas mutantes  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  reportaron la mayor acumulación intracelular de trehalosa (Figura 15). Por otro lado, cumple la hipótesis de que las cepas mutantes acumulan mayor concentración de trehalosa como se ha reportado previamente en *M. acridum*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *B. cinerea* y *M. grisea* (Jin y cols., 2015; Sánchez-Fresneda y cols., 2015; Sánchez-Fresneda y cols., 2014; Garre y Matallana., 2009; Doehlemann y cols., 2006; Foster y cols., 2003). Este dato es importante de resaltar debido a las propiedades protectoras que tiene este disacárido (Bragg y cols., 2017; Fan y Roos, 2016; Feofilova y cols 2014; Golovina y cols., 2010; Teramoto y cols., 2008; Cong-heng., 2016; Jai y cols 2003; Richards y cols., 2002), una mayor cantidad de trehalosa explica ciertos fenotipos observados, especialmente en los ensayos de estrés *in vitro*, sobrevivencia a congelación en nitrógeno líquido y al ayuno extremo.

## 7.3 Comportamiento al ayuno de las cepas $\Delta ath1$ , $\Delta nth1$ y $\Delta ath1::\Delta nth1$ .

Con el fin de determinar la función de la trehalosa como fuente de energía al ser degradada se sometieron las cepas a un ayuno extremo de ocho días y

posteriormente se inocularon en MC sólido para comparar su viabilidad. Los resultados muestran que todas las cepas ( $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$  y WT) incubadas en agua destilada por ocho días sin tratamiento de peróxido de hidrógeno fueron viables (Figura 17), este resultado difiere de lo reportado en *C. parapsilosis* (Sánchez-Fresneda y cols., 2015), donde las dobles mutantes  $atc1\Delta/ntc1\Delta$  aunque no pueden degradar la trehalosa y por lo tanto acumulan mayor cantidad, crecen menos en comparación con las cepas parentales. En contraste a nuestro resultado, las dobles mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$  crecieron prácticamente a la par con las cepas silvestres, esto se podría explicar por la mayor concentración de trehalosa que registraron las cepas  $\Delta ath1::\Delta nth1$ ; sin embargo, las cepas  $atc1\Delta/ntc1\Delta$  de *C. parapsilosis* mostraron también un incremento en la concentración intracelular de trehalosa al igual que en *U. maydis* (Sánchez-Fresneda y cols., 2015).

No descartamos que exista algún sistema de protección a la ausencia de nutrientes en *U. maydis*, no es de sorprender que este fitopatógeno tolere estas condiciones, cabe recordar *U. maydis* se enfrenta a escenarios desfavorables y quizá ha desarrollado un mecanismo de dormancia en la forma de levadura como se ha comprobado en las teliosporas (Ostrowski y cols., 2017). Otra probable explicación a que *U. maydis* tolere este ayuno es que al utilizar sus fuentes de carbono, aunado a la capacidad que tiene para fijar nitrógeno (Ruiz-Herrera y cols., 2015) logre sobrevivir al ayuno, quizá eso explique que las cepas WT tuvieron mayor crecimiento comparado a las cepas  $\Delta ath1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$  relacionando el papel de fuente de carbono que tiene la trehalosa y el menor crecimiento de todas las cepas al tratarlas con 2.5 mM de  $H_2O_2$ .

#### **7.4 Fenotipo de mutantes $\Delta ath1$ , $\Delta ath1::\Delta nth1$ en estrés *in vitro*.**

De acuerdo a nuestros resultados, la exposición a en *U. maydis* aumentó la concentración intracelular de trehalosa (Figura 15); con base en este dato, decidimos pre-tratar con 2.5 mM de  $H_2O_2$  las células para comprobar si la acumulación de trehalosa modifica la respuesta de *U. maydis* al agente estresante.

Los ensayos de estrés para medio ácido (ácido acético 0.015 %) fueron contundentes. Se observó que las cepas  $\Delta ath1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  crecieron un poco más en la dilución de  $1 \times 10^3$  siendo tratadas con  $H_2O_2$ . Para la concentración de 0.5 % y 0.25 %, las células perecieron a diferencia de lo ocurrido en *S. cerevisiae* (Yoshiyama y cols., 2014) donde las cepas  $\Delta nth1$  y  $\Delta nth2$  fueron más lábiles al ácido acético a la concentración de 0.45 % y 0.5 %, además de que estas concentraciones son muy severas al no permitir el crecimiento en *U. maydis*. Por lo tanto *U. maydis* es más sensible a este estrés en comparación con *S. cerevisiae*, sin embargo se demostró que logra tolerar mejor este estrés cuando la concentración de trehalosa es mayor, estableciendo así una correlación entre la concentración de trehalosa con el pre-tratamiento con peróxido, logrando un mayor crecimiento para las mutantes  $\Delta ath1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$ , este resultado fortalece la hipótesis del papel protector de la trehalosa al igual que *S. cerevisiae* (Hu y cols., 2014; Yoshiyama y cols., 2014), además que concuerda con los resultados de Cervantes-Chávez y cols 2016, donde las mutantes que no producen trehalosa de *U. maydis* son más lábiles al crecer en medio de pH 2 (ajustado con ácido acético).

Por otro lado, la radiación ultravioleta genera daños genéticos al inducir la formación de dímeros de las pirimidinas adyacentes, además de oxidar las purinas (Braga y cols., 2015). La respuesta de las cepas mutantes a la exposición de radiación ultravioleta fue contrastante ya que al tratarlas con 2.5 mM  $H_2O_2$ , registraron mayor crecimiento a diferencia de las cepas WT, esto concuerda con nuestra hipótesis ya que dichas cepas son las que tienen una mayor concentración intracelular de trehalosa, además de que las cepas de *U. maydis* que no producen trehalosa, expuestas a la radiación ultravioleta crecieron menos en MM pH 7 en comparación con las cepas parentales (Cervantes-Chávez y cols., 2016). Este resultado es similar con *Metarhizium anisopliae*, ya que una mejor tasa de germinación de las esporas al ser tratadas con luz UV se correlacionó con una mayor concentración de trehalosa y manitol (Rangel y cols., 2006), sin embargo para la levadura extremófila *Aureobasidium melanogenum* la sobre-expresión de *tps1* (que conduce a mayor acumulación de trehalosa) no significó mayor tolerancia a la radiación (Jiang y cols., 2017). Cabe resaltar que en estos ensayos las cepas

utilizadas sí degradan la trehalosa a diferencia de nuestros experimentos. Una posible explicación a este resultado es que la trehalosa actuó como molécula chaperona, remplazando las moléculas de agua en el ADN, así evitando la dimerización de las timinas y por ende una mayor tolerancia a la exposición a radiación UV. Otra posible explicación es que la trehalosa evitó la oxidación de las purinas, al proteger los mecanismos de reparación de ADN: NER nucleotide excision repair y PR photoreactivation aunado a las cualidades que ya se había mencionado (Bragg y cols., 2017; Fan y Roos 2016; Feofilova y cols 2014). También se ha demostrado que la trehalosa logra proteger a las enzimas superóxidodismutasa, protegiendo indirectamente a la célula de los superóxidos (Luo y cols., 2007).

Para los agentes oxidantes utilizamos rosa de bengala, peróxido de hidrógeno y menadiona, se siguió el procedimiento del pre-tratamiento con peróxido de hidrógeno. Para el caso de la menadiona, sabemos que genera superóxidos en presencia de oxígeno haciendo daño en la membrana y ADN (Blokhina y cols., 2003), por este motivo los seres vivos han generado formas de neutralizar estas especies reactivas de oxígeno. Como lo demuestra el trabajo de Nikolaou y cols (2009), *U. maydis* perece a concentraciones de 0.15 mM de menadiona. Nuestros resultados concuerdan con la hipótesis de que el aumento de trehalosa brinda protección a la célula, donde todas las cepas con pre-tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toleraron mejor el efecto de la menadiona a la concentración de 70 µM, creciendo a la concentración de 1X10<sup>5</sup> cel/mL, mientras que las células sin tratamiento crecieron solamente en la concentración de 1X10<sup>6</sup> cel/mL, datos que concuerdan con *S. cerevisiae* (Herdeiro y cols., 2006), además los resultados de las mutantes  $\Delta tps2$  (que no producen trehalosa) crecieron menos con relación a las cepas parentales en presencia de menadiona (Cervantes-Chávez y cols., 2016).

Otro caso de estrés oxidativo es el de rosa del bengala, que en presencia de luz genera oxígeno singulete (Pibiri y cols., 2018). Para *U. maydis* las mutantes  $\Delta nth1$ ,  $\Delta ath1$ ,  $\Delta ath1::\Delta nth1$  lograron mayor crecimiento cuando las células tuvieron el pre-tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que las cepas parentales crecieron menos

(Figura 19), este resultado también concuerda con la hipótesis de que a mayor concentración de trehalosa aumenta la resistencia a diferentes tipos de estrés, ya que las cepas que no producen trehalosa fueron más sensibles en comparación a las WT (Cervantes-Chávez y cols., 2016). Debemos de tener en cuenta que estos resultados pudiesen ser por algún otro mecanismo de resistencia a estrés oxidativo, como lo son la superóxido dismutasa o el factor de transcripción Yap1 que regula la participación de enzimas involucradas en la detoxificación de ROS (Blokhina y cols., 2003, Molina y Kahmann., 2007). Es importante el hecho de que a la trehalosa se le ha relacionado con el factor de transcripción Yap1 (Gounalaki y Thireos., 1994), ya que es probable que actué como chaperona manteniendo el plegamiento funcional de las proteínas encargadas de neutralizar a las especies reactivas de oxígeno (Khalifeh y cols., 2019).

Para determinar la respuesta en estrés de pared celular, se utilizó los ensayos con SDS, calcoflúor blanco y rojo congo. En el caso de SDS sabemos que genera estrés al ser un detergente que solubiliza las manoproteínas de la pared celular de los hongos, y a la vez puede dañar también la membrana (Schroeder y cols., 2018), mientras que el rojo congo y el calcoflúor blanco al tener dos grupos de ácido sulfónico, interactúan con los enlaces  $\beta$  de los glucanos y las cadenas de quitina (Ram y cols., 2006). Con rojo congo las cepas que no tuvieron el pretratamiento de  $H_2O_2$  crecieron igual que la silvestre en la concentración de 35  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo al tratar las cepas con el agente oxidante hubo crecimiento en la dilución de  $1 \times 10^6$  en las cepas  $\Delta\text{ath1}::\Delta\text{nth1}$ , este resultado lo atribuimos a la concentración intracelular de trehalosa y posiblemente tenga interacción con los grupos sulfónicos del rojo congo y proteja así a la pared celular. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito con Nikolaou y cols (2009) con respecto a las cepas parentales a la resistencia a rojo congo, por otro lado, concuerda con nuestra hipótesis los resultados de Cervantes-Chávez y cols., 2016 donde las cepas  $\Delta\text{tps2}$  (que no producen trehalosa) crecieron 40% menos comparadas con el control. Sin embargo, en el caso de *C. parapsilosis* la mutante KO *CpTC1* (mutante *ath1*) fueron más lábiles al rojo congo comparado con las cepas WT (Sánchez-Fresneda y cols.,

2014), esto difiere a lo obtenido en *U. maydis* donde la mutante  $\Delta ath1$  creció a la par con las cepas silvestres.

### **7.5 Resistencia a ultracongelación y la trehalosa en *Ustilago maydis*.**

Como se mencionó anteriormente, se ha comprobado que la trehalosa posee la capacidad de crioprotección (Feofilova y cols., 2014), por ello comprobamos la sobrevivencia de las cepas a la ultracongelación en nitrógeno líquido, según lo descrito por Soto y cols (1999). Nuestros resultados (Figura 16) demuestran que no hubo mayor sobrevivencia a la ultra-congelación entre cepas mutantes y parentales. Sin embargo, sí hubo diferencia al tratar las cepas con  $H_2O_2$ , similar a lo observado en *Schizosaccharomyce pombe* donde una mayor concentración de trehalosa se relacionó directamente con resistencia a la congelación (Soto y cols., 1999).

Cabe mencionar que *U. maydis* y *S. cerevisiae* resisten de manera similar la congelación según los reportes de Lewis y cols., (1995) las cepas WT al ser tratadas con nitrógeno líquido, el 1 % de las células fueron viables (Figura 16), sin embargo *S. pombe* es más sensible puesto que solo el 0.001 % sobrevivió a este estrés. Sugiriendo así que al poseer mayor concentración de trehalosa toleran más la congelación como lo previamente reportado (Tan y cols., 2014; Soto y cols., 1999; Coutinho y cols., 1988).

### **7.6 Cambios estructurales en la pared celular.**

La pared celular de los hongos es la primera barrera de interacción con el medio ambiente y con el hospedero, está relacionada con la morfología de la célula, es rígida y flexible a la vez, es a través de los componentes de la pared celular que el huésped logra identificar al patógeno (Gow y cols., 2016).

Previamente se mostró que la trehalasa ácida *ath1* se reprime al crecer *U. maydis* en forma de hifa en MM pH 3, mientras que la trehalasa neutra, su expresión no cambia (Robledo-Briones y Ruíz-Herrera., 2012), esto puede relacionarse con lo observado en la figura 18, donde al teñir las hifas con calcoflúor blanco los septos de las cepas  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  mostraron diferente distribución y mayor intensidad, mientras en las cepas  $\Delta ath1$  solo hubo cambio en la distribución de los

septos. Otro dato que podría explicar este resultado está relacionado con la composición de azúcares de la pared celular de *U. maydis*, se reporta que del total de los carbohidratos estructurales de la pared celular en forma de levadura, la glucosa ocupa el 26 %, mientras que en forma de hifa es del 41 % (Ruiz-Herrera y cols., 1996), esto podría explicar nuestros resultados ya que la cepa  $\Delta ath1::\Delta nth1$  no es capaz de degradar la trehalosa en glucosa y las cepas  $\Delta ath1$  y  $\Delta nth1$  solo degradan una fracción de la trehalosa.

Otro de nuestros resultados que apuntan al cambio de la estructura de la pared celular en las cepas mutantes, es la secreción de polisacáridos que se relaciona con cambios de la pared celular (Fonseca-García y cols., 2011; Aréchiga-Carvajal y cols., 2005). En la figura 20 se muestra que las cepas  $\Delta ath1$  son las que mayor polisacárido secretaron, mientras que las cepas  $\Delta ath1::\Delta nth1$  fueron concentraciones cercanas al control silvestre, sin embargo la cepa  $\Delta nth1$  fue menor en comparación a la cepa parental. Quizá este resultado tenga que ver con la concentración de trehalosa, ya que de las mutantes, la que menor concentración de polisacárido mostró fue la cepa 569 (mutante  $\Delta ath1$ , figura 15), teniendo mayor glucosa disponible para el anabolismo de los polisacáridos estructurales de la pared, aunado a los arreglos de la pared celular, esta hipótesis respalda los resultados de las cepas mutantes  $\Delta ath1::\Delta nth1$  que secretaron menor cantidad de polisacáridos, en comparación a las cepas  $\Delta ath1$ .

### **7.7 La trehalosa y la patogenicidad en *U. maydis*.**

Los ensayos de patogenicidad en plantas demostraron que las cepas mutantes  $\Delta ath1$  fueron más exitosas en generar síntomas a las plantas de maíz, esto concuerda con los resultados de *C. neoformans* (Botts y cols., 2016) donde las cepas  $\Delta nth2$  fueron “hipervirulentas” en el modelo murino, donde el autor atribuye una posible explicación a este fenotipo sea los posibles cambios de la pared celular, para el caso de *U. maydis* podría ser un posible explicación el éxito que tuvieron las mutantes  $\Delta ath1$ , ya que tuvieron señales de un cambio en la arquitectura de la pared celular, como se demostró en las figuras 18 y 20. Sin embargo, las cepas WT,

$\Delta ath1::\Delta nth1$ ,  $\Delta nth1$  se comportaron de manera similar, esto difiere con los resultados anteriores (López-Cabrera., 2016), donde las cepas  $\Delta nth1$  presentaron más síntomas que las cepas parentales. Esta diferencia podría ser por que las plantas fueron analizadas a los 14 días post-inoculación, mientras que los ensayos anteriores se analizaron a los 30 días, este cambio se ajustó según los estudios de (Schilling y cols., 2014).

Para otras especies de hongos fitopatógenos como *M. grisea*, *B. cinerea* la catálisis de la trehalosa ácida tuvo poca relevancia para infectar a su huésped (Foster y cols., 2003; Doehlemann y cols., 2006) al igual que *U. maydis* en las cepas  $\Delta ath1::\Delta nth1$  y  $\Delta nth1$ . Por otro lado, en patógenos de humanos, tenemos que para *C. parapsilosis* las mutantes *act* $\Delta$  *KO* y *act*  $\Delta$ /*nct*  $\Delta$  *KO* (mutantes a *ath1* y *nth1* respectivamente) fueron menos virulentas (Sánchez-Fresneda y cols., 2015). Datos similares son los del hongo entomopatógeno *M. acridium* (Kai y cols., 2016), ya que las mutantes  $\Delta ATM1$  (mutantes de la trehalasa ácida), tuvieron menor éxito en infectar a *L. migratoria manillensis*.

Una posible explicación de que las cepas  $\Delta ath1::\Delta nth1$  fueron menos exitosas para generar síntomas en las plantas de maíz, es la incapacidad de degradar la trehalosa a glucosa, donde sabemos que las hifas de *U. maydis* necesitan mayor glucosa estructural en la pared celular (Ruiz-Herrera y cols., 1996). Debido a que la doble mutante no logra degradar la trehalosa a glucosa por ende esta glucosa queda secuestrada en forma de trehalosa y no puede ser utilizada para formar la pared celular a diferencia de las cepas silvestres y las mutantes  $\Delta ath1$ . No debemos de descartar que estos resultados cambien al infectar las mazorcas de maíz (Morrison y cols., 2016), o se incrementen los días de análisis post-inoculación (López-Cabrera., 2016).

## Conclusiones

- Los genes *ath1* y *nth1* no son esenciales para la viabilidad en *Ustilago maydis*.
- La capacidad para llevar a cabo el apareamiento en *U. maydis* no es afectada por la delección de los genes *ath1* y *nth1*.
- En *U. maydis*, opera la vía Ath1/Nth1 para la degradación de la trehalosa que permite que este disacárido sea utilizado como fuente de carbono, así como mecanismo de resistencia ante situaciones de estrés.
- Los genes *ath1* y *nth1* están involucrados con la construcción de la pared celular de *U. maydis*.
- El aumento intracelular de trehalosa brinda protección ante condiciones de estrés oxidativo, de pared, radiación UV, bajas temperaturas y ácido.
- *U. maydis* es capaz de tolerar el ayuno en agua destilada.
- Los posibles cambios estructurales de la pared celular que generó la ausencia del gen *ath1* se relacionan con la patogenicidad.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Perspectivas

- Estudiar el fenotipo de las mutantes Agt1 (probable transportador de trehalosa), Tsl1 y Tps3 (Proteínas reguladoras de Tps1) de *U. maydis*.
- Caracterizar las respuestas moleculares del ayuno en *U. maydis*.
- Determinar la localización de las enzimas Ath1 y Nth1 con ensayos de proteínas fluorescentes recombinantes.
- Caracterizar los cambios estructurales de la pared celular de las cepas  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  de *U. maydis* por microscopía electrónica, enzimas líticas y cuantificación de glucanos en la pared celular.
- Caracterizar el fenotipo de las cepas complementadas de  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$ .
- Caracterizar la patogenicidad de las cepas  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$  en plantas de maíz adultas para determinar su efecto en la producción de huitlacoche
- Caracterizar el porcentaje de germinación de las teliosporas en las cepas mutantes  $\Delta ath1$ ,  $\Delta nth1$  y  $\Delta ath1::\Delta nth1$ .

## Bibliografía

Agrios NG. Plant pathology. 5ª. Edición. Inglaterra. Esditorial Elsevier, 2008; vol1:77-79.

Aréchiga-Carvajal E, Ruiz-Herrera J: The *RIM101/pacc* homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. Eukaryot Cell. 2005; 4: 999-1008.

Auesukaree C: Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. j. jbiosc. 2017; 20: 1389-1723.

Banuet F, Herskowitz I: Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1989; 86, 5878-82.

Barraza A, Sánchez F: Trehalases A neglected carbon metabolism regulator?. psb. 2013; 8:7, e24778 DOI: 10.4161/psb.24778.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K: Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany. 2003; 91: 179-194.

Botts R , Huang M, Borchardt K , Hulli M: Developmental cell fate and virulence are linked to trehalose homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. E C ASM. 2014; 13: 1158-1168.

Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J, Kahmann R: Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. MOL. MICRO. 2001; 42:1047-1063.

Braga G, Rangel D, Fernandes E, Flint S, Roberts D: Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. Curr Genet. 2014; DOI 10.1007/s00294-015-0483-0.

Bragg J, D'Ambrosio H, Smith T, Gorka C, Khan F, Rose J, Rouff A, Fu T, Bisnett B, Boyce M, Khetan S, Paulick M: Esterified Trehalose Analogues Protect Mammalian Cells from Heat Shock. *ChemBioChem*. 2017; 18: 1 – 9.

Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Dejamei A, Kahmann R: *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009; 47:423–45.

Brefort T, Tanaka S, Neidig N, Doehlemann G, Vincon V, Kahmann R: Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLOS Pathogens*. 2014; 10(7): e1003866. DOI.org/10.1371/journal.ppat.1003866.

Brumer H: CAZypedia Consortium: Ten years of CAZypedia. a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*. 2018; 28, 3-8. DOI:10.1093/glycob/cwx089

Carillo P, Feil R, Gibon Y, Satoh-Nagasawa N, Jackson D, Bläsing O, Stitt M, Lunn J: A fluorometric assay for trehalose in the picomole range. *Plant Methods*. 2013; 9:1-15.

Castanheira S, Mielnichuk N, Pérez-Martín J: Programmed cell cycle arrest is required for infection of corn plants by the fungus *Ustilago maydis*. *Dev.* 2014; 141; 4817-4826.

Castanheira S, Pérez-Martín J: Appressorium formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis* requires a G2 cell cycle arrest. *PSB*. 2015; 10:4, e1001227.

Cervantes-Chávez J, Valdés-Santiago L, Bakkeren G, Santiago-Hurtado E, León-Ramírez C, Esquivel-Naranjo U, Landeros-Jaime F, Rodríguez-Aza Y, Ruiz-Herrera J: Trehalose is required for stress resistance and virulence of the Basidiomycota plant pathogen *Ustilago maydis*. *mic*. 2016; 162: 1009-1022.

Christensen J: Corn smut Caused by *Ustilago maydis*. APS.1963; 2: 5-35

Colleen E, Cheung K, Spence K, Saville B: Unh1, an *Ustilago maydis* Ndt80-like protein, controls completion of tumor maturation, teliospore development, and meiosis. fgb. 2016; 94: 54-68.

Cong-Heng C, Ting Y, Zhang Q, Yang-Ming He, Li-Hu X, Mino Z, Guang-Rong Z, Yuan Z, Hong-Jie Y, Ping Z: Influence of trehalose on human islet amyloid polypeptide fibrillation and aggregation. RSC Adv. 2016; 6: 15240-15246.

Coutinho C, Bernardes E, Félix D, Panek A: Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. JBT.1988; 7 : 23-32.

d'Enfert C, Binini B, Zapella P, Fontaine T, Da Silva A, Terenzi H: Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Mol.Microbiol.1999; 32: 471-483.

Davidson R , Blantenship J , Kraus P , Berrio K , Hull C , D'Souza C, Wang P, Heitmann J: A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. Microbiol. 2002; 148: 2607-26015.

Dean R, Van-Kan J, Pretorius Z, Hammond-Kosack E, Pietro A, Spanu P, Jason J, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster D: The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant. Pathol. 2012; 13: 414-430.

Djamei A y Kahmann R: *Ustilago maydis*: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. PLOS Pathogens. 2012; 8(11): e1002955. DOI.org/10.1371/journal.ppat.1002955.

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

Elbain A , Pan Y , Pastuszak I, Carroll D: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glyco. Biol.* 2003; 13: 17R-27R

Eleutherio E, Panek A, De Mesquita J, Trevisol E, Magalhaes R: Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr Genet* .2015; 61: 263–274.

Fan F, Roos Y: Crystallization and structural relaxation times in structural strength analysis of amorphous sugar/whey protein systems. *J. Food Hyd.* 2016; 60:85-97.

Feofilova E , Usov A , Mysyakina, Kochkina G: Trehalose: Chemical structure, biological functions and practical application. *Microbiol.* 2014; 83: 184-194.

Ferreira C , Paschoalin M, Panek D, Trugo C: Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. *Food Chem.* 1997; 60: 251-254.

Fonseca-García C, López M, Aréchiga-Carvajal E, Ruiz-Herrera J: A novel polysaccharide secreted by *pal/rim* mutants of the phytopathogen fungus *Ustilago maydis*. *Carbohydr Polym.* 2011; 86: 1646-1650.

Foster J , Jenkinson J, Talbot N: Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J.* 2003; 22(2): 225-235.

Garre E y Matallana E: The three trehalases *Nth1p*, *Nth2p* and *Ath1p* participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *mic.* 2009; 155: 3092-3099.

Garre E, Matallana E: The three trehalases *Nth1p*, *Nth2p* and *Ath1p* participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 2009; 155: 3092-3099.

Geissmann Q: OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *Plos ONE.* 2013; 8: e54072. DOI:10.1371/journal.pone.0054072

Golovina E, Golovin A, Hoekstra F, Faller R: Water Replacement Hypothesis in Atomic Details: Effect of Trehalose on the Structure of Single Dehydrated POPC Bilayers. *acs*. 2010; 26: 18-26 DOI: 10.1021/la100891x.

Gow N, Latge JP, Munro C: The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectrum*. 2016; DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.

He S, Bystricky K, Leon S, Francois J, Parrou Jean: The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. *FEBS Journal*. 2009; 276: 5432–5446

Heimel K, Scherer M, Vranes M, Wahl R, Pothiratana C, Schuler D, Vincon V, Finkernagel F, Flor-Parra I, Kämper J: The transcription factor *rbf1* is the master regulator for *bmating* type controlled pathogenic development in *ustilago maydis*. *PLoSPathogens*. 2010; 6(8): e1001035. DOI. org/10.1371/journal.ppat.1001035

Holliday R: The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet*. 1961; 2: 204–230.

Hu J, Wei M, Mirzaei H, Madia F, Mario M, Amparo C, Chagoury S, Kennedy B, Longo V: Tor-Sch9 deficiency activates catabolism of the ketone body-like acetic acid to promote trehalose accumulation and longevity. *Aging Cell*. 2014; 13: 457–467 DOI: 10.1111/accel.12202

Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B: Trehalose Metabolism: From osmoprotection to signaling. *Int J Mol SCI*. 2009; 10:3793-3810.

Jai K, Rajiv B: Why is trehalose an exceptional protein stabilizer?. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 26458-26465.

Jain N, Roy I: Effect of trehalose on protein structure. *Pro.Sc*: 2009; DOI: 10.1002/pro.3

Jiang H, Liu G, Chi Z, Hu Z, Chi Z: Genetics of trehalose biosynthesis in desert-derived *Aureobasidium melanogenum* and role of trehalose in the adaptation of the yeast to extreme environments. *Curr Genet*. 2017; DOI 10.1007/s00294-017-0762-z.

Jin K, Peng G, Liu Y, Xia Y: The acid trehalase, ATM1, contributes to the in vivo growth and virulence of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Fungal Genet Biol*. 2015; 77: 61-67.

Jules Matthieu, Guillou V, Francois J, Parrou L: Two Distinct Pathways for Trehalose Assimilation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004; 70: 2771-2778.

Kai J, Peng G, Liu Y, Xia Y: The acid trehalase, ATM1, contributes to the in vivo growth and virulence of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Fungal Genet Biol*. 2015; 77: 61-67.

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, *et al*: Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 2006; 444: 97-101.

Khalifeh M, Barreto G, Sahebkar A: Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol*. 2019; 176: 1173-1189.

Koch E, Koch F: The presence of trehalose in yeast. *Science*. 1925; 61-1587: 570-572.

Lanver D, Müller A, Happel P, Haas F, Franitza M, Pellegrin C, Reissmann S, Altmüller J, Rensing S, Kahmann: The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant cell tpc*. 2018; DOI org/10.1105/tpc.17.00764

Lanver D, Tollot M, Schweizer, Lo Presti L, Reissmann S, Ma L, Tonaka S, Liang L, Ludwig N, Kahmann R: *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. Nat. Rev. Microbiol. 2017; DOI:10.1038/nrmicro.2017.33.

Liu C, Dunaway-Mariano D, Mariano P: Rational design of first generation inhibitors for trehalose 6-phosphate phosphatases. j.tet. 2017; 73: 1324-1330.

Liu T, Zhu L, Zhang Z, Huang H, Zhang Z, Jiang L: Protective role of trehalose during radiation and heavy metal stress in *Aureobasidium subglaciale* F134. 2018; DOI:10.1038/s41598-017-15489-0.

López Cabrera A.(2016): Estudio funcional del gen *NTH1* que codifica la trehalasa neutra en el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro. México.

Lunn J, Delorge I, María Figueroa C, Van Dijck P, Stitt M: Trehalose metabolism in plants. The Plant Journal. 2014; 79: 544–567

Luo Y, Li W, Wang W: Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. Environ. Exp. Bot. 2007; 63:378-384.

Luyckx J, Baudouin C: Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. Clinical ophthalmology. 2011; 5:577-581.

Macakova E, Kopecka M, Kukucka Z, Veisova D, Novak P, Man P, Obsil T, Obsilova V: Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalasa *Nth1*. BiochimBiophysActa. 2013; 1830:4491-4499.

Mahmud S, Hirasawa T, Shimizu H: Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses.j.jbiosc.2010; 109: 262-266.

Matei A, Doehlemann G: Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Curr. Opin Microbiol.* 2016; 34: 60-66.

Michelle E, Raizada M: Fungal Pathogens of Maize Gaining Free Passage Along the Silk Road. *PATHCD.* 2018; DOI: 10.3390/pathogens7040081.

Minh L, Hyuck S, Yoon J, Kim Y, Min J: Effect of acid trehalase (ATH) on impaired yeast vacuolar activity. *EMT.* 2016; 93:44-50.

Molina L, Kahmann: An *Ustilago maydis* Gene Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxification Is Required for Virulence. *The Plant Cell.* 2007; 19: 2293-2309.

Morrison E, Emery N, Saville B: Phytohormone Involvement in the *Ustilago maydis*-*Zea mays* Pathosystem: Relationships between abscisic acid and cytokinin levels and strain virulence in infected cob tissue. *Plos One.* 2016; 10(6): e0130945. DOI:10.1371/journal.pone.0130945.

Ngamskulrungrroj P, Himmelreich U, Breger J, Wilson C, Chayakulkeeree M, Krockenberger M, Malik R, Heide-Marie D, Toffaletti D, Djordjevic J, Mylonakis E, Meyer W, Perfect J: The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gatti*. *Infect Immun.* 2009; 77: 4584-4596.

Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfiel I, Brown A: Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol.* 2009; DOI:10.1186/1471-2148-9-44.

Olicón-Hernández D, Araiza-Villanueva M, Pardo J, Aranda E, Guerra-Sánchez G: New insights of *Ustilago maydis* as yeast model for genetic and biotechnological research: a review. .2019; 76: 917-926.

Ostrowsky L, Saville B: Natural antisense transcripts are linked to the modulation of mitochondrial function and teliospore dormancy in *Ustilago maydis*. *mmi*. 2017; 103(5), 745–763.

Parrou J, Jules M, Beltran G, Francois J: Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. *FEMS yeast research*. 2005; 5: 503-511.

Parrou JL, Jules M, Beltran G, Francois J: Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function: *FEMS Yeast Research*. 2005; 5: 503–511.

Pedreño Y, González-Párraja P, Martínez-Esparza M, Sentandreu R, Valentín E, Argüelles J C: Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decrease hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiol*. 2007; 153: 1372-1381.

Perez-Nadales E, Almeida MF, Baldin C, Castanheira S, Ghalid M, Grund E, Lengeler K, Marchegiani E, Vinod P, Moretti M, Naik V, Oses-Ruiz M, Oskarsson T, Schafer K, Wassestrom L, Brakhage A, Gow N, Kahmann R, Lebrum MH, Perez-Martin J, Di Pietro A, Talbot J, Walther A, Wendland J: Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet Biol*. 2014; 70:42-67.

Pibirí J, Buscemi S, Piccionello A, Pace A: Photochemically Produced Singlet Oxygen: Applications and Perspectives. *ChemPhotoChem*. 2018; DOI: 10.1002/cptc.201800076

Ram A, Klis F: Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. Nat. Protoc. 2006; DOI:10.1038/nprot.2006.397.

Rangel D, Anderson A, Roberts D: Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. j.jip. 2006; 93: 127-134.

Richar A B, Krsen Dakowka, Dexter L B, Schmid H, Wolterbeek A P M, Waalkens-Berend D H, Shigoyuki A, Kurimoto M: Trehalose: a review of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chem. Toxicol. 2002; 40: 871-898.

Richards A, Krakowka S, Dexter L, Schmid H, Wolterbeek A, Waalkens- Richards A B, Krakowka Berendsen, Shigoyuki A, Kurimoto M: Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. j. fct. 2002; 40: 871-898.

Robledo-Briones M, Ruiz-Herrera J: Transcriptional Regulation of the Genes Encoding Chitin and  $\beta$ -1,3-Glucan Synthases from *Ustilago maydis*. Curr Microbiol. 2012; 65:85-90

Ruiz-Herrera J, León C, Carabez-Trejo A, Reyes-Salinas E: Structure and Chemical Composition of the Cell Walls from the Haploid Yeast and Mycelial Forms of *Ustilago maydis*. Fungal Genet Biol. 1996; 20:133-142.

Ruiz-Herrera J, León-Ramírez C, Vera-Nuñez A, Sánchez-Arreguín A, Ruiz-Medrano R, Salgado-Lugo H, Sánchez-Segura L, Peña-Cabriales J: A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. New Phytol. 2015; 207: 769-777.

Ruiz-Herrera J: Viaje al asombroso mundo de los hongos. 1ª. edición. México: Fondo de Cultura Económica, 2012; vol.1:99.

Salmerón K, Pardo P, Flores O, Mendozá G, Miranda M, Guerra G: Response to osmotic stress and temperature of the fungus *Ustilago maydis*. Arch Microbiol. 2011; 193: 701-709.

Sambrook J & Russell DW: Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Maicas S, Argüelles J: In *Candida parapsilosis* the ATC1 gene encodes for an acid trehalase, involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. PLOS One. 2014; 9(6) e99113.

Sánchez-Fresneda S, Guirao-Abad J, Martínez-Esparza M, Maicas S, Valentín E, Argüelles J: Homozygous deletion of ATC1 and NTC1 genes in *Candida parapsilosis* abolishes trehalase activity and affects cell growth, sugar metabolism, stress resistance, infectivity and biofilm formation. Fungal Genet Biol. 2015; 85:45-57.

Savanström A, Melin P: Intracellular trehalase activity is required for development, germination and heat-stress resistance of *Aspergillus niger* conidia. Res Microbiol. 2012;164:1-9.

Schroeder L, Ikui A: Tryptophan confers resistance to SDS associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE. 2018; 14(3): e0199484. DOI.org/10.1371/journal.pone.0199484

Scilling L, Matei A, Redkar A, Walbot V, Doehlemann G: Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. Mol Plant Pathol. 2014; 15(8): 780-789

Serneels J, Tounu H, Van-Dijck P: Tight control of trehalosa content is required for efficient heat-induced cell elongation in *Candida albicans*. J Biol Chem. 2012; 44: 36873-36882.

Soto T, Fernández J, Vicente-Soler J, Cansado J, Gacto M: Accumulation of Trehalose by Overexpression of *tps1*, Coding for Trehalose-6-Phosphate Synthase,

Causes Increased Resistance to Multiple Stresses in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65: 2020-2024.

Srasri K, Thongroj M, Chaijiraaree P, Thiangtham S, Manuspiya H, Pisitsak P, Ummartyotin S: Recovery potential of cellulose fiber from newspaper waste: An approach on magnetic cellulose aerogel for dye adsorption material. *ijbiomac*. 2018; 119:662-668.

Taga t, Senma M, Osaky K: The cristal and molecular structure of trehalose dehydrate. *Acta Crystallogr Sect B Sci*. 1972; 3145-3158.

Tan H, Don J, Wang G, Xu H, Zhang C, Xiao D: Enhanced freeze tolerance of baker's yeast by overexpressed trehalose-6-phosphate synthase gene (TPS1) and deleted trehalase genes in frozen dough. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014; 41: 1275-1285.

Teramoto N, Sachinvala N, Shibata M: Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. *Molecules*. 2008; 13: 1773-1816.

Thammahong A, Cafrey-Card A, Dhingra S, Obar D, Cramer R: *Aspergillus fumigatus* Trehalose-Regulatory Subunit Homolog Moonlights To Mediate Cell Wall Homeostasis through Modulation of Chitin Synthase Activity. *mBio*. 2017; 8: e00056-17. DOI.org/10.1128/mBio.00056-17.

Thammahong A, Puttikamonkul S, Perfect JR, Brennan RG, Cramer R: Central role of the trehalose biosynthesis pathway in the pathogenesis of human fungal infections: opportunities and challenges for therapeutic development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017; 81:e00053-16. DOI.org/10.1128/MMBR.00053-16.

Thompson S, Borchardt D: Glucogenic blood sugar formation in an insect *Manduca sexta* L.: synthesis of trehalose from <sup>13</sup>C enriched pyruvate. *cbpb*. 2003; 135: 461-471.

Trevisol E , Panek D , Mesquita F, Eleutherio C: Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP dependent phosphorylation. *Biochem Biophys Acta*. 2013; 1840: 164-1650.

Tsukuda T, Carleton S, Fotheringham S, Holloman W K. Isolation and characterization of autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *MCB*. 1998; 8: 3703-3709.

Valdez-Azúa R, Moreno F A, Gómez A G. Cuijtla-cochi: El Cuitla-coche. 1ª edición. México: UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad universitaria, 04510, Del. Coyoacán, Ciudad de México, 2011; vol.1: 41-42.

Van-Dijck, Colavizza D, Smet P, Thevelein J: Differential importance of in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl environ microbiol*. 1995; 61: 109-115.

Wyatt G, Kalf G: The chemistry of insect hemolymph. *J. Gen. Physiol*. 1957; 40(6): 833-847.

Velez-Haro J, Martínez-Soto D, Guevara-Olivera L, Ruiz-Herrera J: *Ztf1*, an *Ustilago maydis* transcription factor involved in virulence. *Eur J Plant Pathol*. 2019; DOI.org/10.1007/s10658-019-01877-x

Yoshiyama Y, Tanaka K, Yoshiyama K, Hibi M, Ogawa J, Shima J: Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. *J. Biosci. Bioeng*. 2014; 119: 172-175.

Zähringer H, Holzer H, Nwaka S: Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. Eur. J. Biochem. 1998; 255: 544-551.

Zhang D, Xiao Z, Zeng B, Li K and Tang Y: Insect Behavior and Physiological Adaptation Mechanisms Under Starvation Stress. Front. Physiol. 2019; 10:163. DOI: 10.3389/fphys.2019.00163

Dirección General de Bibliotecas UNQ

## **Apéndice**

### **I. Preparación de medios de cultivo**

#### **I.I Elementos traza 500 mL**

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

#### **I.II LB (Luria Bertani) 1 L**

- 10 g Bacto-Triptona
- 10 g Cloruro de Sodio
- 5 g Extracto de Levadura

#### **I.III Medio Completo**

- 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

#### **I. IV Medio Completo Doble más Sorbitol (DCM-S) 250 mL**

- 45.5 g Sorbitol
- 5 g Extracto de Levadura
- 2.5 g Pectona
- 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 (agregar después de esterilizar)

#### **I.V Medio Completo más Carbón Activado, 1 L**

- 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

#### **I.VI Medio Mínimo pH 3 (MM pH 3) 1 L**

- 1 % (m v<sup>-1</sup>) Glucosa
- 3 g Nitrato de Potasio
- 62.5 mL Solución de Sales
- Ajustar pH con Ácido Clorhídrico

#### **I.VII Medio Mínimo pH 7 (MM pH 7) 1 L**

- 1 % (m v<sup>-1</sup>) Glucosa
- 3 g Nitrato de Amonio
- 62.5 mL Solución de Sales
- 2 % (m v<sup>-1</sup>) Agar bacteriológico (En caso de ser medio sólido)
- 30 mM Tris HCl pH 7 (Agregar al medio después de esterilizar)
- Ajustar con Hidróxido de Sodio si no se utiliza tampón

#### **I.VIII Solución de Sales 1 L**

- 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

### **II. Formación de protoplastos y transformación de *Ustilago maydis***

#### **II.I Amortiguador II**

- 25 mM Tris HCl 7.5
- 25 mM Cloruro de Calcio
- 1 M Sorbitol

#### **II.II Enzimas líticas**

- 100 mg Enzimas líticas
- 1 mL tampón II

#### **II.III Heparina**

- 15 mg Heparina
- 1 mL STC frío

#### **II.IV Polietilenglicol (PEG) 40 %**

- 4 g PEG
- 10 mL STC

#### **II.V SCS**

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

#### **II.VI STC**

- 10 mM Tris HCl pH 7.5
- 100 mM Cloruro de Calcio
- 1 M Sorbitol

Dirección General de Bibliotecas UAQ