

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DEL MECANISMO DE SUMOILACIÓN EN *Ustilago maydis*

POR

L.B.G. ANA LUISA RIOS HOLGUÍN

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2019

ESTUDIO DEL MECANISMO DE SUMOILACIÓN EN *Ustilago maydis*

Comité de tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Presidente



M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez
Secretario



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Vocal 1



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal 2



Dr. José Santos García Alvarado
Vocal 3

ESTUDIO DEL MECANISMO DE SUMOILACIÓN EN *Ustilago maydis*

Comité de tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Director



Dr. José Ruiz Herrera
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me ayudaron de buena voluntad a estar aquí, ¡GRACIAS!

Se agradece atentamente al CONACYT por el apoyo y financiamiento de este proyecto (clave No.252373). Al CINVESTAV unidad Irapuato, especialmente al Laboratorio de Diferenciación y Desarrollo de Hongos por haberme recibido

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1	<i>Ustilago maydis</i>	3
2.2	Sumoilación	5
2.3	E1 – activación	8
2.4	E2 – conjugación	8
2.5	E3 – ligasa	9
2.6	Desumoilación por proteínas Ulp	10
2.7	E3 ligasa Siz1	10
2.8	Siz1 frente a condiciones de estrés.....	11
2.9	Siz1 y las septinas	12
2.10	Técnica de PCR de Doble Unión (Yu <i>et al.</i> , 2004)	14
2.11	Técnica de triple recombinación “Split – marker” (Catlett <i>et al.</i> , 2003).....	15
2.12	Microscopía de fluorescencia	16
III.	JUSTIFICACIÓN.....	18
IV.	HIPÓTESIS.....	19
V.	OBJETIVOS	20
5.1	Objetivo general	20
5.2	Objetivos específicos	20
VI.	MATERIALES	21
6.1	Soluciones	21
6.1.1	Gel de electroforesis con agarosa 1%.....	21
6.1.2	Protoplastos y transformación de <i>Ustilago maydis</i> (Método modificado de Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	21
6.1.3	Extracción de ADN de organismos eucariotes (Sambrook y Russel, 2001) ..	21
6.1.4	Regulador de fosfato salino (PBS) 1x	21
6.2	Medios de cultivo	22
6.2.1	Solución de sales (Holliday, 1961).....	22
6.2.2	Medio completo (MC) (Holliday, 1961)	22
6.2.3	Doble medio completo – sorbitol (DCM-S) (Método modificado de Tsukuda <i>et al.</i> , 1988).....	22

6.2.4	Medio Mínimo (MM) (Holliday, 1961)	22
6.3	Cepas y material genético.....	23
6.3.1	Cepas de <i>Ustilago maydis</i>	23
6.3.2	Casete de interrupción para el gen <i>SIZ1</i> (Rios-Holguín, 2017).....	23
6.4	Análisis bioestadístico.....	24
6.4.1	IBM SPSS Statistics	24
VII.	MÉTODOS.....	25
7.1	ETAPA I: Identificación de los componentes de la vía de sumoilación	25
7.1.1	Diseño de sondas aminoácidas <i>in silico</i> para la búsqueda de los componentes de la vía de sumoilación	25
7.2	ETAPAI: Generación de mutantes <i>Δsiz1</i>	27
7.2.1	Marcador de peso molecular Lambda PstI (λ -pstI)	27
7.2.2	Gel de electroforesis de agarosa al 1% (Sambrook y Russel, 2001)	27
7.2.3	Formación de protoplastos de <i>Ustilago maydis</i> (Método modificado de Tsukuda <i>et al.</i> , 1988).....	28
7.2.4	Método de interrupción de genes por split - marker (Catlett <i>et al.</i> , 2003)	28
7.2.5	Transformación de protoplastos de <i>Ustilago maydis</i> con ADN (Método modificado de Tsukuda <i>et al.</i> , 1988).....	30
7.2.6	Extracción de ADN de organismos eucarióticos (Sambrook y Russel, 2001).....	31
7.2.7	Comprobación de la mutación por PCR y restricción	32
7.3	ETAPA III: Caracterización fenotípica de la mutante	35
7.3.1	Curva de resistencia a higromicina.....	35
7.3.2	Cinética de crecimiento	35
7.3.3	Tinción con blanco de calcofluor	35
7.3.4	Tinción con DAPI.....	36
7.3.5	Estrés por temperatura	37
7.3.6	Estrés por pH	37
7.3.7	Estrés por choque iónico y osmótico	37
7.3.8	Estrés sobre la pared celular	37
7.3.9	Estrés oxidativo	38
7.3.10	Estrés por radiación UV	38
7.3.11	Inducción de la transición dimórfica por pH o fuentes de carbono (Ruiz-Herrera <i>et al.</i> , 1995; Klose <i>et al.</i> , 2004)	38
7.3.12	Determinación del apareamiento por la técnica Fuzz (Banuett y Herskowitz, 1989)	39

7.3.13	Capacidad de infección en plantas de maíz	40
VIII.	RESULTADOS	41
8.1	ETAPA I. Identificación de los componentes de la vía de sumoilación	41
8.1.1	Diseño de sondas aminoacídicas <i>in silico</i> para la búsqueda de los componentes de la vía de sumoilación	41
8.2	ETAPA II. Generación de mutante Δsiz1	46
8.2.1	Método de interrupción de genes por split – marker (Catlett <i>et al.</i> , 2003).....	46
8.2.2	Comprobación de la mutación por PCR y restricción	48
8.3	ETAPA III. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes	52
8.3.1	Curva de resistencia a higromicina.....	52
8.3.2	Cinéticas de crecimiento.....	54
8.3.3	Estrés por temperatura	71
8.3.4	Estrés por pH	74
8.3.5	Estrés por choque iónico y osmótico.....	77
8.3.6	Estrés en la pared celular	80
8.3.7	Estrés oxidativo	84
8.3.8	Estrés por radiación UV	86
8.3.9	Dimorfismo inducido por pH ácido.....	88
8.3.10	Dimorfismo inducido por ácidos grasos.....	90
8.3.11	Dimorfismo inducido por el acetato como fuente de carbono.....	92
8.3.12	Capacidad de apareamiento por la técnica de Fuzz.....	94
8.3.13	Capacidad de infección en plantas de maíz	95
IX.	DISCUSIÓN.....	101
X.	CONCLUSIONES	107
XI.	PESPECTIVAS.....	108
XII.	BIBLIOGRAFÍA	109
XIII.	RESUMEN BIOGRÁFICO	119
XIV.	SUPLEMENTARIOS	120

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Ustilago maydis</i>	3
Tabla 2. Sondas aminoacídicas.....	25
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el método de Split-marker	30
Tabla 4. Programa de PCR utilizado para amplificar los fragmentos 5' y 3' de Split – marker.	30
Tabla 5. Oligonucleótidonucleótidos empleados para la comprobación de la mutación	33
Tabla 6. Programa de PCR utilizado para amplificar el ORF de SIZ1 y el fragmento de externos.....	33
Tabla 7. Programa de PCR utilizado para amplificar los controles de actina y detección de higromicina	34
Tabla 8. Componentes de la vía de sumoilación encontrados en <i>U. maydis</i>	41
Tabla 9. Factores de transcripción que se unen al promotor de SIZ1.....	45
Tabla 10. Cambio de pH de cinética en MM pH4	56
Tabla 11. Cambio de pH de cinética en MM pH7	61
Tabla 12. Cambio de pH de cinética en MM pH9	66
Tabla 13. Tamaño de plantas de maíz	99
Tabla 14. Presencia de antocianinas en plantas de maíz.....	99
Tabla 15. Presencia de clorosis en plantas de maíz	99
Tabla 16. Tamaño y localización de tumores en plantas de maíz	100
Tabla 17. Talla de las plantas de maíz	100
Tabla 18. Mediciones de absorbancia de la cinética de crecimiento en MM pH4.....	120
Tabla 19. Mediciones de absorbancia de la cinética de proteína en MM pH4	121
Tabla 20. Mediciones de absorbancia de la cinética de crecimiento en MM pH7.....	122
Tabla 21. Mediciones de absorbancia de la cinética de proteína en MM pH7	123
Tabla 22. Mediciones de absorbancia de la cinética de crecimiento en MM pH9.....	124
Tabla 23. Mediciones de absorbancia de la cinética de proteína en MM pH9	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	4
Figura 2. Mecanismo general del sistema de sumoilación	8
Figura 3. Técnica de PCR de Doble Unión.....	15
Figura 4. Técnica de triple recombinación “Split – marker”.....	16
Figura 5. Interrupción de genes por Split – marker	29
Figura 6. Enzimas de restricción utilizadas.	34
Figura 7. Alineamiento <i>in silico</i> de los componentes de la vía de sumoilación	44
Figura 8. Dominios presentes en Siz1 de <i>U. maydis</i>	44
Figura 9. Casete de interrupción.....	47
Figura 10. Fragmentos de PCR 5’ y 3’ para la transformación.....	48
Figura 11. ADN de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2	48
Figura 12. Presencia/ausencia del ORF de <i>SIZ1</i>	49
Figura 13. Diferencia de tamaño de los fragmentos silvestres y mutantes.....	50
Figura 14. Detección del gen de resistencia a higromicina	50
Figura 15. Control de actina.....	51
Figura 16. Comprobación de la mutante por cortes enzimáticos.....	52
Figura 17. Resistencia a higromicina de cepas silvestres y mutantes	53
Figura 18. Cinética de crecimiento en MM pH4	55
Figura 19. Cinética de proteína en MM pH4	56
Figura 20. T0 de la cinética de crecimiento en MM pH4.....	57
Figura 21. T24 de la cinética de crecimiento en MM pH4.....	58
Figura 22. T48 de la cinética de crecimiento en MM pH4.....	59
Figura 23. Cinética de crecimiento en MM pH7	60
Figura 24. Cinética de proteína en MM pH7	61
Figura 25. T0 de la cinética de crecimiento en MM pH7	62
Figura 26. T24 de la cinética de crecimiento en MM pH7.....	63
Figura 27. T48 de la cinética de crecimiento en MM pH7	64

Figura 28. Cinética de crecimiento en MM pH9	65
Figura 29. Cinética de proteína en MM pH9	66
Figura 30. T0 de la cinética de crecimiento en MM pH9	67
Figura 31. T24 de la cinética de crecimiento en MM pH9.....	68
Figura 32. T48 de la cinética de crecimiento en MM pH9	69
Figura 33. Control en MC.....	71
Figura 34. Estrés por temperatura	74
Figura 35. Estrés por pH.....	77
Figura 36. Estrés por choque iónico y osmótico	80
Figura 37. Estrés por pared celular	84
Figura 38. Estrés oxidativo	86
Figura 39. Estrés por radiación UV	87
Figura 40. Dimorfismo inducido por pH ácido.....	89
Figura 41. Dimorfismo inducido por ácidos grasos.....	91
Figura 42. Dimorfismo inducido por el acetato como fuente de carbono	93
Figura 43. Fuzz entre las cepas silvestres y mutantes	94
Figura 44. Síntomas de la infección por <i>U. maydis</i> en plantas de maíz	98

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico

BLAST – basic local alignment search tool

°C – grados centígrados

cm – centímetro

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol

dNTP's – desoxinucleótidos trifosfato

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético

gr – gramo

Kb – kilo pares de bases

L – litro

M – molar

mg – miligramo

µg – microgramo

mL – mililitro

µL – microlitro

mM – milimolar

NCBI – National Center of Biotechnology Information

nm – nanómetro

Oligonucleótido – oligonucleótidonucleótido

Pb – pares de bases

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

Rpm – revoluciones por minuto

SDS – lauril sulfato de sodio

SUMO – small ubiquitin-like modifier

Tm – temperatura de fusión

Tris – 2-amino-2hydroxymethyl-propane-1,3-diol

U – unidades

RESUMEN

La sumoilación es una modificación postraducciona que está involucrada en muchos procesos esenciales para las células eucariotes, tales como la división celular, respuesta a estrés, reparación del ADN y patogenicidad, entre muchos otros; por esto, es un tema de interés para muchos investigadores. Este mecanismo ha sido ampliamente descrito en *Arabidopsis*, vertebrados, y en eucariotes simples, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis* no ha sido estudiado este mecanismo, ni se han caracterizado por completo los elementos involucrados, pero creemos que tiene un papel importante en la respuesta a estrés de diferentes factores, y en la deposición de septos.

En este estudio se trabajó con el gen *SIZ1* (UM03696) de *U. maydis* que es clave para el mecanismo de sumoilación. Se interrumpió su marco de lectura abierto generando una mutante para cada tipo sexual: LP1 (*alb1Δsiz1::hyg*) y LP2 (*a2b2Δsiz1::hyg*), y se caracterizó el fenotipo de estas mutantes registrando su capacidad de respuesta a situaciones de estrés, para diferenciarse en presencia de diferentes estímulos y para infectar a la planta de maíz. La interrupción del gen *SIZ1* parece afectar la integridad y calidad de las septinas ya que, al momento de formar filamentos o hifas, se observa una formación mucho menor de estos. En el caso de la virulencia, esta se ve atenuada en las mutantes ya que inducen tumores más pequeños.

ABSTRACT

The sumoylation is a postranslational modification that is involved in many essential processes for eukaryotic cells, such as cellular division, stress response, DNA repair and pathogenicity, among many others; which is why it's a topic of interest for many researchers. This mechanism has been widely described in *Arabidopsis*, vertebrates, and in simpler eukaryotes, such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, this mechanism hasn't been studied, nor have the elements involved been fully characterized, but we believe that it has an important role in response to different stress factors and in septa deposition.

In this study we worked with the *SIZ1* gene (UM03696) of *U. maydis* that is key to the mechanism of sumoylation. It's open reading frame was interrupted generating a mutant of each sexual type: LP1 (*a1b1Δsiz1::hyg*) and LP2 (*a2b2Δsiz1::hyg*), and the phenotype of these cells was characterized by registering their capacity to respond to stress situations, to differentiate in the presence of different stimuli and to infect de corn plant. The interruption of *SIZ1* seems to affect the integrity and quality of septins, given that at the moment of filament or hyphae formation, a much smaller of this is observed, even during the infection to the plants because they are not so aggressive and show smaller tumors.

I. INTRODUCCIÓN

El *phylum* Basidiomycota comprende una gran variedad de especies dentro del reino Fungi. El subphylum *Ustilaginomycotina* incluye fitopatógenos que causan los llamados “carbones” (Wang *et al.*, 2015) y dentro de este se encuentra *Ustilago maydis*, el hongo que infecta al maíz el cual es utilizado como modelo de estudio por su facilidad para propagarlo en medios artificiales y por su fase dimórfica (Kahmann y Kämper, 2004). Se han estudiado en este organismo sistemas de virus, reparación y recombinación de ADN, ciclo celular, señalización, y como modelo de interacción entre hongos y plantas (Brachmann *et al.*, 2004). Además, el estudio de las modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, nedilación y la sumoilación está tomando importancia por estar estrechamente involucradas en la patogenia de los hongos (Leach y Brown, 2012).

La sumoilación es una modificación postraduccional que ayuda a la interacción, localización, estabilidad o actividad de ciertas proteínas (Melchior *et al.*, 2003). Se caracteriza por la adición de una proteína SUMO (small ubiquitin-like modifier) con la ayuda de tres enzimas principales: E1 (Aos1/Uba2) encargada de la activación, E2 (Ubc9) que realiza la conjugación con el sustrato, y E3 (Siz1) que realiza la ligación y confiere especificidad hacia el sustrato (Figura 2) (Xhemalce *et al.*, 2004). Siz1 es específico para ciertos sustratos como las septinas, factores de splicing, y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Yunus y Lima, 2009). Interrumpiendo el gen *SIZ1* en el genoma de *U. maydis* se puede relacionar en qué sistemas está involucrada la vía de sumoilación en este organismo, que se cree que ayuda en la respuesta a condiciones adversas como estrés nutritivo, pH, oxidación, temperatura, entre otros (Zhou *et al.*, 2004; Johnson y Gupta 2001) y en la formación de los septos como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Johnson y Gupta, 2001).

En este trabajo, se caracterizó parcialmente el sistema de sumoilación en *U. maydis* a partir de la interrupción de uno de sus efectores más importantes (Siz1) y determinando su respuesta a diferentes condiciones de estrés, en la formación de septos, y además analizando la repercusión de esta mutación sobre la infección a plantas de maíz. Esto

contribuye al entendimiento de su función en *U. maydis* y su capacidad de adaptación a las condiciones variantes de los ambientes en que se desarrolla. Estos resultados podrían ser extrapolables a otros hongos del *phylum* Basidiomycota.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Ustilago maydis*

Ustilago maydis es un hongo Basidiomycota dimórfico patógeno perteneciente a la orden de los Ustilaginales (Tabla 1) que infecta al maíz provocando la formación de tumores o agallas en la planta bajo ciertas condiciones, causando pérdidas económicas. Huitlacoche es el nombre que le dieron los aztecas a los tumores formados. El huitlacoche ha sido consumido por gente del centro de México por muchos años y es considerado como una delicia culinaria tanto en este país como en muchos otros (Valverde *et al.*, 1995; León-Ramírez *et al.*, 2014). Lo han clasificado dentro del grupo de nutraceuticos, ya que posee

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ustilago maydis*

REINO	<i>Fungi</i>
DIVISIÓN	<i>Basidiomycota</i>
SUBFILUM	<i>Ustilaginomycotina</i>
CLASE	<i>Ustilaginomycetes</i>
SUBCLASE	<i>Ustilaginomycetidae</i>
ORDEN	<i>Ustilaginales</i>
FAMILIA	<i>Ustilaginaceae</i>
GÉNERO	<i>Ustilago</i>
ESPECIE	<i>Maydis</i>

altos niveles de oligonucleótidosacáridos y fibra dietética que han demostrado estar involucrados en la disminución del riesgo de padecer cáncer de colon; además de contener compuestos fenólicos relacionados con actividad antioxidante (Beas *et al.*, 2011).

Al ser dimórfico, *U. maydis*, puede crecer tanto en forma de levadura como formar hifas. En la parte de su ciclo de vida como levadura, permanecen como células haploides saprófitas y no son capaces de infectar a la planta. En esta forma es fácil su propagación en condiciones de laboratorio por lo que ha surgido como un modelo para el estudio de la interacción planta – hongo (Brachmann *et al.*, 2004). Sin embargo, se necesita la fusión de dos células haploides sexualmente compatibles para formar un dicarion que crece en forma de hifas, las cuales también dependerán de su huésped para el crecimiento (Bölker, 2001). Este fenómeno es controlado por la asociación de los productos de los genes localizados en el bilocus *a* y el multilocus *b*; es decir que se reconocen los receptores de feromonas que residen en cada alelo. El alelo *a* codifica para un sistema de feromonas y

un receptor que permiten el reconocimiento de las células para aparearse y poder fusionarse. El destino del dicarion está dictado por el locus *b* que codifica para un par de factores con homeodominios, llamados bE y bW (Brefort *et al.*, 2009). La formación de un heterodímero formado por los factores bE y bW de células compatibles (be/bW) desencadena una serie de reacciones para el desarrollo de la patogenicidad estimulando la activación de genes que son factores de patogenicidad (Feldbrügge *et al.*, 2004).

Cuando el dicarion se encuentra en contacto con la planta de maíz, y el homeodominio bE/bW este activo, el hongo procede a infectar a la planta formando un apresorio. Posterior a la infección, las hifas se dispersan rápidamente y a partir del quinto día existe un cambio cuando el micelio se septa y se forman las teliosporas diploides que llenan los tumores. Las teliosporas son una forma de dispersión y resistencia a las condiciones adversas (Kahmann y Kämper, 2004). Junto con la formación de los tumores, existen otros síntomas característicos de la infección como la presencia de clorosis (tejido amarillento), formación de antocianinas (tejido de color rojo y/o café) y la reducción en el crecimiento (Bannuet, 1995). Al final, las teliosporas son liberadas cuando el tumor se rompe o se seca. Al encontrarse de nuevo en las condiciones favorables, las teliosporas germinan y el núcleo entra en meiosis y brotan células haploides repitiéndose el ciclo con la formación del

promicelio (Brefort *et al.*, 2009) (Figura 1).

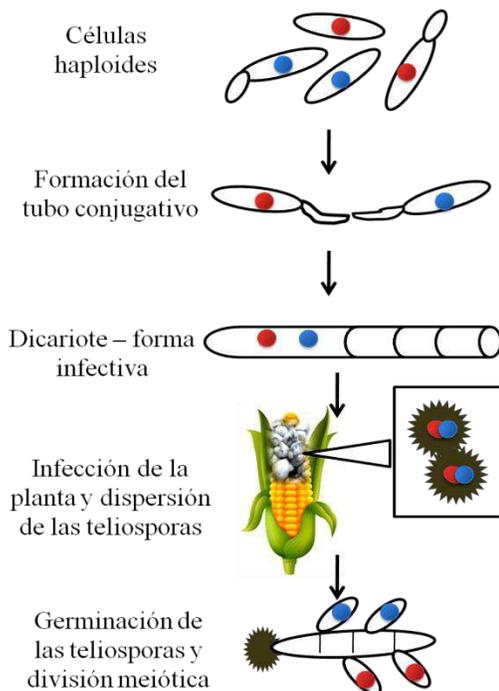


Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Empieza con dos células haploides que son sexualmente compatibles (núcleos de color azul y rojo) que se conjugan para formar el dicarion que va a infectar a la planta y por último la germinación de las teliosporas fúngicas.

El fenómeno del dimorfismo que sufre este hongo se ha logrado reproducir en condiciones de laboratorio bajo diferentes inductores de manera aislada (fuera de la planta). Desde hace tiempo, se ha descrito que el pH ácido induce el dimorfismo levadura – micelio en *U. maydis* de cepas haploides (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). La adición de ácidos grasos como fuente de carbono como el palmitato, ácido linoléico y esteárico, que son comúnmente encontrados en la planta de maíz (Klose *et al.*, 2004), inducen la formación de filamentos más alargados y delgados. Otro inductor es la inanición de nutrientes y se dice que la vía cAMP – PKA es la responsable de responder a estos estímulos ambientales (Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2001).

Por otro lado, *U. maydis* ha surgido en los últimos años como uno de los hongos fitopatógenos más estudiados que, junto con *Cryptococcus neoformans*, constituyen los modelos de estudio en Basidiomycotas (Brachmann *et al.*, 2004). Análisis genómicos han demostrado que *U. maydis* está más estrechamente relacionado a los humanos que otros organismos del reino Fungi. Numerosas proteínas son compartidas entre *U. maydis* y *Homo sapiens* como, por ejemplo, el transporte de larga distancia, mitosis, organización de microtúbulos, entre otros (Steinberg y Pérez-Martin, 2009).

El genoma de *U. maydis* tiene un tamaño de 20.5Mb distribuidos en 28 contigs que corresponden a 23 cromosomas. Según la base de datos de *U. maydis* (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>) se han identificado 6784 genes donde algunos siguen sin anotación. Esto permite la detección y análisis de muchos genes nuevos de importancia, los cuales pueden ser extrapolables a otras especies de fitopatógenos.

2.2 Sumoilación

Muchas proteínas son esenciales para los procesos celulares y, por consiguiente, en la patogenia de los hongos. Sin embargo, la actividad de ellas depende en gran medida de las modificaciones postraduccionales que puedan sufrir. Estas constan de procesamientos covalentes que cambian las propiedades de las proteínas, ya sea escindiéndolas o agregándoles grupos funcionales a ciertos aminoácidos. En los últimos años, la

ubiquitinación, nedilación y la sumoilación, han sido objeto de estudio por su participación en los procesos de virulencia de los hongos (Leach y Brown, 2012).

La sumoilación es una modificación postraducciona covalente reversible que involucra tres reacciones principales que ayudan en la interacción de proteínas. Se caracteriza por la adición de una proteína llamada SUMO (small ubiquitin-like modifier) que fue descrita por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* con su homólogo Smt3 donde se relacionó como supresor de una mutación en Mif2 (Zhou *et al.*, 2004). En los eucariotes como levaduras, nematodos e insectos, solo se tiene una copia de SUMO llamada comúnmente Smt3, en tanto que en los vertebrados existen y se expresan 3 parálogos conocidos como SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3, y en plantas se expresan hasta ocho versiones de SUMO (Girdwood *et al.*, 2004; Kurepa *et al.*, 2003). Entre los miembros de la familia SUMO existe un porcentaje de similitud de 47% entre SUMO-1 y Smt3, estas versiones las utiliza la célula para modificar proteínas en condiciones basales, mientras que SUMO 2/3 y Smt3, tienen una similitud de 45% y se expresan preferentemente en condiciones de estrés como temperaturas altas (Dohmen, 2004).

SUMO consiste en una familia de proteínas altamente conservadas presentes en todos los organismos eucariotes. Desde su descubrimiento en 1996, se ha encontrado que se une a más de 50 proteínas, incluidas c-jun, desacetilasas de histonas, p53, y otras que participan en la transcripción, reparación del ADN, transporte nuclear, transducción de señales y en el ciclo celular (Johnson, 2004). Su modificación puede modular su interacción, localización, estabilidad o actividad (Melchior *et al.*, 2003). SUMO es una proteína de 12kDa que comparte en su secuencia un 18% de identidad con la ubiquitina, no obstante, la sumoilación no lleva a la degradación de proteínas, incluso, en algunos casos, puede llegar a ser antagonista de la ubiquitinación al estabilizar a la proteína (Zhao y Blobel, 2005). Se han descrito algunos mecanismos de regulación en humanos, por ejemplo, la sumoilación del factor $\text{I}\kappa\beta$ bloquea el residuo de lisina donde se une la ubiquitina para inducir su degradación por el proteosoma, también puede inducir cambios conformacionales en algunas proteínas como la ADN glicosilasa involucrada en la reparación del ADN, y por último la unión covalente de SUMO puede conferir nuevas interacciones (Gill, 2005).

SUMO se une covalentemente a su sustrato por medio de un enlace amida entre una glicina de su extremo C-terminal y el ϵ -amino de un residuo de lisina dentro de un motivo de la proteína blanco ($\Psi K x E/D$), donde Ψ es un aminoácido hidrofóbico, generalmente leucina, isoleucina o valina; K es la lisina que es modificada en el ϵ amino; x es cualquier aminoácido; y E/D puede ser un ácido glutámico o aspártico (Dohmen, 2004; Johnson, 2004; Johnson y Gupta, 2001; Melchior *et al.*, 2003). La unión a esta lisina es la clave para la unión de SUMO y por consiguiente de su actividad, ya que, por ejemplo, se ha descrito que un cambio en la lisina por arginina en el factor de transcripción Sp3, elimina su actividad inhibitoria en la transcripción sin afectar la unión al ADN (Ross *et al.*, 2002). Este proceso es dependiente de ATP y requiere de 3 pasos principales: la activación por la enzima E1 (Aos1/Uba2), la conjugación por la enzima E2 (Ubc9), y la ligación por la enzima E3 ligasa (Figura 2); y estas enzimas son específicas para la sumoilación, a pesar de la similitud con la ubiquitinación (Lim *et al.*, 2018). En contraste con la ubiquitinación, donde E3 ayuda al reconocimiento, la unión de SUMO es mediada en gran parte por la enzima E2, ya que es la que reconoce el residuo de lisina en el motivo de la proteína blanco, sin embargo, la E3 ligasa puede ayudar en la especificidad al sustrato, a estabilizar la interacción E2-sustrato, a orientar hacia la lisina aceptora o contribuir a la conjugación (Melchior *et al.*, 2003).

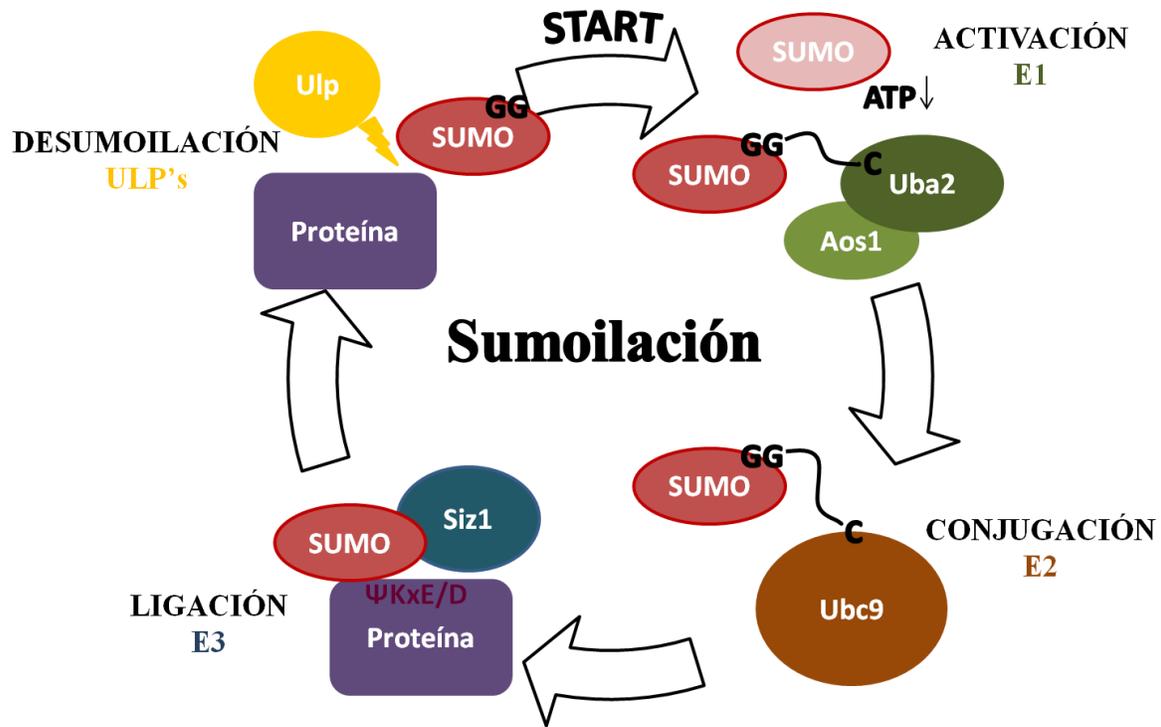


Figura 2. Mecanismo general del sistema de sumoilación. Comienza con la activación de la forma madura de SUMO con la ayuda de ATP para formar el enlace tioéster con el heterodímero E1. Esta forma activa es transferida a una cisteína de la enzima Ubc9 (E2) que va a catalizar la unión a una lisina dentro de un motivo conservado ($\Psi KxE/D$) del sustrato con la ayuda de una E3 ligasa. La desumoilación por las proteínas ULP deja libre a SUMO para que vuelva a su forma inactiva.

2.3 E1 – activación

En *S. cerevisiae*, la enzima de activación E1 funciona como un heterodímero formado por Aos1 y Uba2. El proceso comienza cuando el extremo C-terminal de SUMO, reacciona con ATP para formar adenilato – SUMO. Uba2 contiene un residuo de cisteína que es un sitio activo, el grupo tiol de esta cisteína ataca al adenilato – SUMO liberando AMP para formar un enlace tioéster entre SUMO y E1. Finalmente, SUMO activado es transferido a la cisteína de Ubc9 (Johnson, 2004; Müller *et al.*, 2001).

2.4 E2 – conjugación

Como se mencionó anteriormente la enzima de conjugación E2, es la encargada de reconocer y unirse al motivo consenso en el sustrato ($\Psi KxE/D$). Ubc9 une a SUMO por un

residuo de cisteína y parece ser que reconoce a la lisina del motivo por un surco hidrofóbico presente en Ubc9. En este surco, un ácido aspártico establece puentes de hidrógeno con la lisina que ayuda a la catálisis (Dohmen, 2004). Se dice que la eliminación de Ubc9 es letal (Melchior, 2000) y también se ha demostrado que Ubc9 es esencial para la sumoilación durante la reparación del ADN (Maeda *et al.*, 2004). Todo este mecanismo se ha descrito en *S. cerevisiae*.

2.5 E3 – ligasa

Hasta la fecha, se han identificado tres familias que actúan como SUMO E3 ligasa. La primera comprende al factor de importación nuclear RanBP2, que modifica proteínas nucleares como SP100 y HDAC4 (Xhelmance *et al.*, 2004). RanBP2 se expresa en vertebrados y pertenece a la familia del complejo de poro nuclear (NPC por sus siglas en inglés). Estas proteínas median el intercambio de iones, metabolitos y macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma. Ran cataliza el cambio de conformación entre GDP a GTP (Sakin *et al.*, 2015).

La segunda, se descubrió con la proteína del polycomb Pc2 que potencia la modificación del represor transcripcional CtBP1 (Xhelmance *et al.*, 2004). Esta E3 ligasa, también es expresada en vertebrados (Dasso, 2008).

Por último, la tercera familia categorizada como E3 ligasa, se encuentra en todos los eucariotes y posee variantes de dominios parecidos a dedos RING (RING-finger like domain SP-RING). Este tipo de E3 son llamados Siz (dominios SAP y dedos-Miz) en levaduras, y en vertebrados PIAS (proteínas inhibidoras de STAT activado). En levaduras se han identificado dos E3 llamados Siz1 y Siz2, mientras que en vertebrados se han descrito cinco E3, que son PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS β y PIAS γ (Dasso, 2008). Siz1 y Siz2 son proteínas de 904 y 726 aminoácidos respectivamente, idénticos en uno del otro en ~470 aminoácidos en el extremo N-terminal, mientras que su extremo C-terminal no son similares entre sí, ni con ninguna otra proteína (Johnson y Gupta, 2001). Siz1 y Siz2 potencian la sumoilación de muchos substratos, sin embargo, muestran especificidad por algunos de ellos. Siz1 modifica proteínas como las septinas. Siz2 parece estar relacionado

con el anclaje de los telómeros para prevenir recombinaciones, y en la señalización de daño celular durante la senescencia (Ferreira *et al.*, 2011).

2.6 Desumoilación por proteínas Ulp

La eliminación del grupo SUMO de la proteína blanco se lleva a cabo por las proteínas Ulp (por sus siglas en inglés ubiquitin-like protein specific proteases) que son miembros de la familia de proteasas de cisteína C48 y que en su secuencia contienen un dominio catalítico caracterizado por la triada catalítica (histidina, aspartato y cisteína) y que hacia su extremo N – y C – terminales difieren entre cada miembro, dándoles una actividad para diferentes sustratos (Yeh, 2009). En la levadura se han descrito dos proteasas de este tipo, que son Ulp1 y Ulp2 que poseen actividad isopeptidasa (Li y Hochstrasser 2000; Geiss y Melchior, 2007).

La interrupción del gen *ULP1* ha revelado que tiene una actividad importante tanto en la maduración de SUMO como en su escisión (Li y Hochstrasser, 1999), mientras que mutantes del gen *ULP2* muestran la acumulación de cadenas poli – SUMO por lo que se considera el más importante para la desumoilación (Schwienhorst *et al.*, 2000; Bylebyl, 2003).

2.7 E3 ligasa Siz1

La cristalografía de rayos X, revela que en *S. cerevisiae*, Siz1 contiene un dominio PINIT en el extremo N-terminal, un dominio central SP-RING y un dominio único en la región C-terminal SP-CTD. PINIT está conformado por dos hojas β plegadas antiparalelas. SP-RING está compuesto por hojas β plegadas y α -hélices, además de que participa junto con un ion Zn^{2+} (Yunus y Lima, 2009). Cuando se interrumpen regiones de los dominios SP-RING y PINIT se elimina prácticamente, la función de Siz1 sobre el proceso de sumoilación (Reindle *et al.* 2006). En otras bases de datos se incluye una secuencia llamada dominio SAP (factor de fijación de andamio) hacia el extremo N- terminal que le ayuda en

la unión al ADN. Sin embargo, se dice que este dominio no es esencial para estimular la sumoilación (Reindle *et al.*, 2006, Parker *et al.*, 2008).

E3, y específicamente el dominio SP-RING, es la encargada de activar la unión E2-SUMO en el enlace tioéster, además de asociarlos y coordinarlos para optimizar la unión con la lisina blanco (Yunus y Lima, 2009). Por esto, son llamadas “moléculas puente”, ya que su principal función, es la de facilitar la unión entre E2 y el sustrato (Takahasi *et al.*, 2001).

En la levadura, Siz1 se concentra en el núcleo de células en interfase, pero se relocaliza en el cuello de la yema durante la mitosis (Melchior, 2003). Es específico para sustratos que incluyen a las septinas, factores de splicing, y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Yunus y Lima, 2009).

2.8 Siz1 frente a condiciones de estrés

Se ha relacionado la presencia de la vía de sumoilación en la adaptación a diferentes tipos de estrés, incluso, Zhou y colaboradores (2004), describieron que en *S. cerevisiae*, existe un nivel relativamente bajo de proteínas sumoiladas en ausencia de estrés. En este trabajo, encontraron que en presencia de H₂O₂ 1mM y 10% de etanol en el medio, los niveles de sumoilación aumentaban considerablemente, y, además, que las proteínas Siz1 y Siz2 eran autosumoiladas. También, en *Magnaporthe oryzae* observaron que el estrés oxidativo dado por H₂O₂ es el factor que induce el más alto nivel de sumoilación (Liu *et al.*, 2018). Por otro lado, en *U. maydis* se ha reportado que resiste H₂O₂ 0.8mM y que genes involucrados en la prevención de la acumulación de ROS, como *YAPI*, también influyen en su patogenicidad (Molina y Kahmann, 2007).

En *S. cerevisiae*, la ausencia de los genes *SIZ1* y *SIZ2*, ya sea individualmente o en conjunto, provocan en la célula sensibilidad a situaciones de estrés como temperaturas frías de 20°C y exposición a luz UV, y, sobre todo, presentan dificultad para crecer aún en las condiciones adecuadas (Johnson y Gupta, 2001). *U. maydis*, desde décadas atrás, es conocido por ser un organismo resistente a la radiación que posee un mecanismo de

reparación de ADN eficiente, tolerando en su forma haploide dosis de hasta 342 J/m² de radiación UV con una supervivencia del 37% (Leaper *et al.*, 1980). También se analizó la expresión diferencial de genes en *U. maydis* exponiéndolo a cambios de pH y se encontró que el gen *SIZ1* se mostraba activo a un pH de 3 (Franco Farías, 2014).

En plantas, se ha descrito el papel de Siz1 en diversos procesos de respuesta a estrés como tolerancia a temperaturas altas y bajas, sequías y cobre, entre otros (CaYoo *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007; Catala *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

2.9 Siz1 y las septinas

En *S. cerevisiae* durante la detención del ciclo celular en G₂/M, la presencia de SUMO es más abundante en las proteínas llamadas septinas que son miembros de la familia de proteínas del citoesqueleto. Esta levadura expresa cinco septinas durante el crecimiento vegetativo: Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 y Sep7/Shs1; donde Cdc3, Cdc11 y Sep7 contienen sitios para sumoilación en un residuo de lisina (Johnson y Gupta, 2001) aunque una investigación reciente revela que Cdc12 también posee un potencial sitio de sumoilación (Liu *et al.*, 2018). Las septinas también pueden sufrir otras modificaciones postraduccionales como lo son la acetilación y la fosforilación (Gladfelter, 2010). Así mismo se ha descrito que cepas mutantes en los sitios blanco de sumoilación, son viables y se comportan como cepas silvestres, lo que sugiere que la sumoilación no juega un papel esencial en la dinámica de las mismas septinas (Melchior, 2000).

Las septinas componen una familia altamente conservada de proteínas de unión a trifosfato de guanosina (GTP) que está presente en todos los eucariotes, excepto en las plantas. En *S. cerevisiae*, componen un anillo de filamentos de 10nm que rodean el cuello de la yema y son necesarias para una gemación y citocinesis normal de la célula (Johnson y Gupta, 2001). La citocinesis se refiere a la separación física de las células después de la mitosis. En la pared celular de los hongos la citocinesis se da mediante la formación de septos donde las septinas son el mayor componente (Böhmer *et al.*, 2009).

Las septinas son reconocidas como componentes del citoesqueleto por su apariencia de filamentos, así como por su asociación con la membrana celular y con filamentos de

actina y microtúbulos (Mostowy y Cossart, 2012). En *U. maydis* se han encontrado cuatro septinas principales (Sep1 – 4) (Pan *et al.*, 2007), que corresponden respectivamente a los homólogos en *S. cerevisiae*, Cdc3, Cdc10, Cdc11 y Cdc12 (Boyce *et al.*, 2005), y que juegan un papel crucial en la integridad de la célula y en la morfogénesis (Álvarez y Pérez 2010). En *C. albicans*, las mutantes de *Cdc10* y *Cdc11* son viables, pero presentan defectos durante la citocinesis, en la localización de la quitina en la pared celular y en la morfología de la yema (Warena y Konopka, 2002). Se ha observado que las septinas Sep1, Sep2 y Sep3 en *U. maydis* se localizan en el ápice y en el medio de la célula, y Sep4 se extiende de polo a polo a través de la levadura y se co-localizan con los microtúbulos (Alvarez-Tabarés y Pérez-Martín, 2010; Gladfelter, 2010). Además, ocurren dos eventos de septación en *U. maydis*, un primer septo se forma en el cuello de la célula madre gemando, y un segundo evento en la célula hija (Böhmer *et al.*, 2009).

Las mutaciones en *sep3* de *U. maydis* provocan aberraciones en su morfología y división celular, en la respuesta a la formación de filamentos en presencia de lípidos y para desarrollar correctamente todos los síntomas durante la infección en plantas de maíz (Boyce *et al.*, 2005). También se ha demostrado que las septinas ayudan en la virulencia y en la germinación de teliosporas (Álvarez y Pérez 2010). En el Ascomycota *Aspergillus flavus* se ha descrito que la sumoilación afecta el fenotipo, respuesta a estrés, producción de conidias y de esclerocios, en la biosíntesis de aflatoxinas y en su proceso de patogenicidad, por lo que juega un papel importante en su virulencia (Nie *et al.*, 2016). Además, existe evidencia de que, algunos hongos fitopatógenos como *Botrytis cinérea* y *Plectosphaerella cucumerina* atacan la maquinaria de sumoilación de la planta durante el desarrollo patogénico (Castaño-Miquel *et al.*, 2017).

En otra investigación, afirman que la maquinaria de sumoilación en *Magnaporthe oryzae* es crucial para la infección a la planta, ya que mutando cada uno de los componentes de la vía, se observa una disminución en los síntomas de la infección, siendo las cepas más afectadas las mutadas en *Δsmt3* y *Δubc9* (Liu *et al.*, 2018)

2.10 Técnica de PCR de Doble Unión (Yu *et al.*, 2004)

La técnica de PCR de Doble Unión (Double Joint PCR), es una técnica que utiliza la eficiencia de la amplificación de fragmentos específicos por medio de PCR convencional. Se divide en tres rondas principales de PCR, donde se amplifican las secuencias flanqueantes, que pueden ser un promotor y un terminador, de la secuencia a interrumpir, y la amplificación de un marcador de selección (Yu *et al.*, 2004). El diseño de oligonucleótidos es la clave para crear fragmentos que puedan superponerse y crear un solo amplificado que incluya estas tres secuencias que serán utilizadas para la transgénesis. Una gran ventaja de esta técnica es la eliminación de los pasos de ligación y clonación en vectores (Hammond *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2004). Incluso, se ha descrito que existe un aumento en el reemplazo de genes utilizando fragmentos de ADN generados por PCR en comparación con el uso de plásmidos en *U. maydis* (Kämper, 2004).

Se deben diseñar cuatro pares de oligonucleótidos para las reacciones de PCR, como se observa en la figura 3, el oligonucleótido 1 y 2 sirven para amplificar el segmento del promotor donde el 2 es un oligonucleótido quimérico y contiene parte de la secuencia del marcador o gen de resistencia. De la misma manera, el oligonucleótido 3 es quimérico y, junto con el oligonucleótido 4, amplifican el terminador del gen deseado. Los oligonucleótidos 5 y 6 delimitan al marcador y estos tres segmentos se amplifican por separado en una primera ronda de PCR, después, los fragmentos resultantes de la primera ronda se integran en una segunda ronda de PCR, donde no se agregan oligonucleótidos. Por último, se diseñan los oligonucleótidos 7 y 8 que son anidados para el casete de interrupción y es lo que se utiliza para la transformación. Este protocolo puede ser adaptable para diseñar casetes de interrupción o para integrar secuencias de interés.

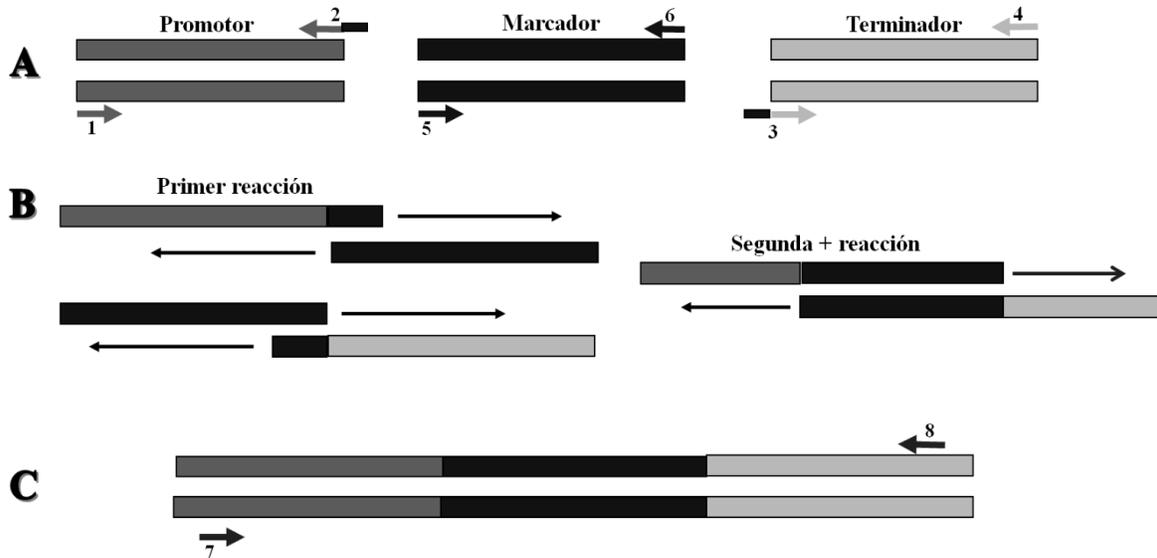


Figura 3. Técnica de PCR de Doble Unión. Se lleva a cabo por tres reacciones principales de PCR. La primera (A) se amplifican el promotor, marcador y terminador; la segunda (B) se integran los tres fragmentos anteriores y no se añaden oligonucleótidos; por último (C) se lleva a cabo una reacción anidada del casete de interrupción.

Se ha descrito que el uso de la técnica de PCR de Doble Unión es más efectiva y rápida con el uso de un fuerte marcador de selección y que tiene una mayor frecuencia de integración que otros (Kim *et al.*, 2009). En hongos filamentosos, se necesitan fragmentos largos de ADN mayores de 500 pb para que suceda la recombinación homóloga ya que se ha demostrado que con tamaños de 0.5 a 1.0 kb, el rendimiento de reemplazo es de 2 al 15%, pero con tamaños de 2 a 3 kb, el rendimiento incrementa de 8 a 20% (Yu *et al.*, 2004).

2.11 Técnica de triple recombinación “Split – marker” (Catlett *et al.*, 2003)

El método de “Split – marker” es un método que consta de dos reacciones de PCR y que no requiere la clonación de fragmentos en vectores (Catlett *et al.*, 2003). Puede empezar a partir de un casete de interrupción generado por el método de PCR de Doble Unión, incluso, se pueden utilizar los mismos oligonucleótidos. Teniendo como referencia la figura 4, se utilizan los oligonucleótidos forward y reverse anidados y de detección de

higromicina que, al realizar las reacciones de PCR, darán lugar a dos productos que están representados con los oligonucleótidos verdes, y el otro, con los oligonucleótidos azules.

Esta técnica ha sido utilizada en otros hongos como *C. neoformans* y *Cercospora nicotianae* obteniendo una efectividad de recombinación de hasta 50% (You *et al.*, 2009).

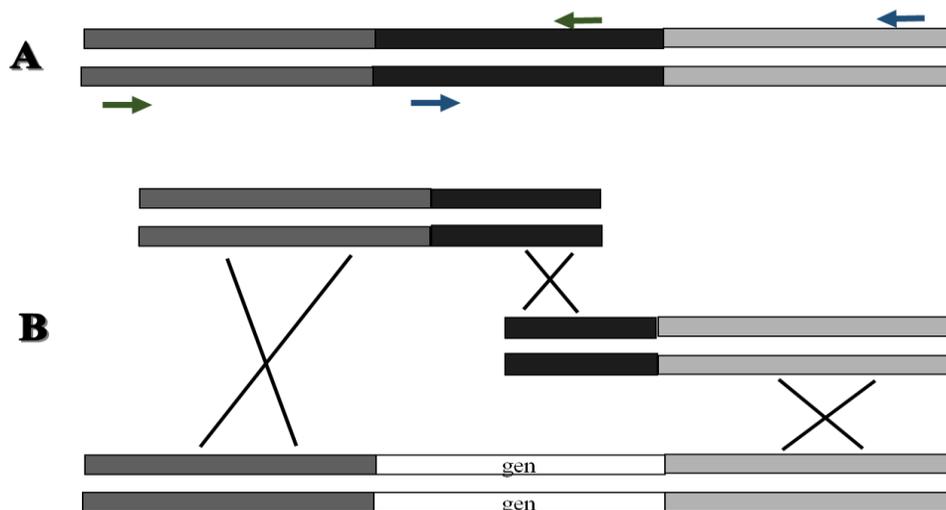


Figura 4. Técnica de triple recombinación “Split – marker”. Parte de un casete de interrupción que se va a fragmentar en dos partes teniendo una región solapante.

2.12 Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia es la emisión de luz que ocurre en nanosegundos después de la absorción de luz de una longitud de onda menor. Filtrando la luz excitante sin bloquear la emisión de fluorescencia, es posible observar solamente los objetos fluorescentes (Lichtman y Conchello, 2005).

El uso del compuesto DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) fue propuesto desde 1978, y ha sido ampliamente usado por ser específico, altamente fluorescente y adecuado para la citometría de flujo de ADN de todo tipo de células, núcleos o cromosomas (Otto, 1990). Este compuesto es utilizado para observar la distribución del núcleo en células individuales, donde el complejo DAPI-ADN exhibe su máxima emisión de fluorescencia a 450nm emitiendo un color azul (Gomes *et al.*, 2013).

Otro compuesto muy útil para la caracterización del fenotipo en hongos es el blanco de calcofluor para la visualización de la pared celular. La pared celular de hongos es una estructura compleja compuesta principalmente de polisacáridos cristalinos como lo son la quitina y las β -glucanas. El blanco de calcofluor tiene la capacidad de unirse a la quitina y a la celulosa y se puede observar al ser excitado a 346nm (Gonçalves *et al.*, 2006) para observar la distribución de quitina en la pared.

III. JUSTIFICACIÓN

Conocer la manera en que las células funcionan y responden a estímulos ambientales es de vital importancia para explicar su comportamiento ya sea individualmente, o en conjunto. Las modificaciones postraduccionales en las células pueden determinar la activación, modificación o inactivación de las proteínas. La sumoilación es una modificación postraduccionl que está involucrada en procesos fundamentales para la célula como la división celular, respuesta a estrés, reparación de ADN y patogenicidad, entre otros. En *S. cerevisiae* se estima que alrededor de 300 a 400 proteínas son reguladas por el proceso de sumoilación en algún momento, esto equivale al 5-10% de todas las proteínas presentes en la célula. Caracterizar la sumoilación en *U. maydis* puede proveer información sobre estos mecanismos post traduccionales. Utilizando a *Ustilago maydis* como modelo de estudio por su facilidad de propagación, puede servir como base para el estudio de estos mecanismos en otros hongos Basidiomycota fitopatógenos de interés.

IV. HIPÓTESIS

El gen homólogo a *SIZ1* de la ruta de sumoilación existe en *Ustilago maydis* y participa en la regulación de diversas respuestas a estrés incluida la variación del pH ambiental.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Caracterizar la presencia y componentes del sistema de sumoilación en *Ustilago maydis*

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar *in silico* los componentes del sistema de sumoilación en *Ustilago maydis*
- Caracterizar los sistemas de respuesta a estrés en los que se encuentra involucrado el sistema de sumoilación en *Ustilago maydis*

VI. MATERIALES

6.1 Soluciones

6.1.1 Gel de electroforesis con agarosa 1%

- La agarosa al 1% es disuelta en regulador TBE 1X el cual se preparó de una solución concentrada 10X que contiene 108gr de Tris, 55gr de ácido bórico y 40mL de EDTA 0.5M pH 8 por litro.

6.1.2 Protoplastos y transformación de *Ustilago maydis* (Método modificado de Tsukuda *et al.*, 1988)

- La solución SCS contiene citrato de sodio 20mM a pH 5.8 y con sorbitol 1M.
- La solución STC se prepara con TRIS-HCl 10mM a pH 7.5 con CaCl₂ 100mM y sorbitol 1M.

6.1.3 Extracción de ADN de organismos eucariotes (Sambrook y Russel, 2001)

- El regulador NTES contiene NaCl 1M, TRIS pH 7.5 1M, EDTA pH 8 0.5M y SDS al 20%.
- Para preparar la solución de fenol, se mezclaron fenol, cloroformo y alcohol ismoamílico en una relación 25:24:1

6.1.4 Regulador de fosfato salino (PBS) 1x

- 1L de PBS contiene 8.0gr de NaCl, 0.2gr de KCl, 1.42gr de Na₂HPO₄, 0.24gr de KH₂PO₄ disueltos en agua bidestilada

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Solución de sales (Holliday, 1961)

- La solución de sales se prepara para 1L con 16gr de KH_2PO_4 , 4gr Na_2SO_4 , 8gr de KCl , 2gr de MgSO_4 , 1gr de CaCl_2 y 8mL de la solución de elementos traza.
- La solución de los elementos traza contienen 60mg de H_3BO_3 , 140mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$, 400mg de ZnCl_2 , 40mg de $\text{Na}_2\text{MgMoO}_4$, 100mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ y 400mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$ en 1L de agua bidestilada.

6.2.2 Medio completo (MC) (Holliday, 1961)

- Para preparar 1L de MC se requieren 2.5gr de peptona de caseína, 10gr de extracto de levadura, 1.5gr de nitrato de amonio, 62.5mL de solución de sales y 10gr de glucosa la cual se esteriliza por separado. En caso de requerir MC sólido, se agregó agar bacteriológico al 2%.

6.2.3 Doble medio completo – sorbitol (DCM-S) (Método modificado de Tsukuda *et al.*, 1988)

- Por litro, se requieren 10gr de casaminoácidos, 3gr de nitrato de amonio, 20gr de extracto de levadura, 125mL de solución de sales, 182.2gr de D-sorbitol, agar al 2% y 10gr de glucosa esterilizada por separado. Para preparar placas de DCM-S sólido se agregó agar bacteriológico al 2%.

6.2.4 Medio Mínimo (MM) (Holliday, 1961)

- Para 1L de MM pH 3, se necesitan 3gr de nitrato de amonio, 62.5mL de solución de sales y 10gr de glucosa esterilizada por separado. El pH fue llevado con ácido

fosfórico 85% y Tris 3.5M. El MM a pH 4, 7 o 9, fue preparado de la misma manera cambiando el nitrato de amonio por nitrato de potasio en la misma cantidad. En caso de requerir MM sólido, se agregó agar bacteriológico al 2%.

6.3 Cepas y material genético

6.3.1 Cepas de *Ustilago maydis*

- Se utilizaron las cepas silvestres FB1 con un genotipo *alb1*, y la cepa silvestre sexualmente compatible FB2 con su genotipo *a2b2* (Banuett y Herskowitz, 1989). La cepa BMA mutante con genotipo *a2b2Δrim101::hyg* (Aréchiga et al., 2005) proporcionada por la Unidad de Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, fue utilizada como control positivo de resistencia a higromicina. Por último, las cepas mutantes generadas en este trabajo fueron LP1 (*alb1Δsiz1::hyg*) LP2 (*a2b2Δsiz1::hyg*).

6.3.2 Casete de interrupción para el gen *SIZ1* (Rios-Holguín, 2017)

- Fragmento generado con la técnica de Double Joint PCR (Yu *et al.*, 2004), que contiene el marcador de selección de resistencia a Higromicina, flanqueado por el promotor y terminador del gen *SIZ1* proporcionado por la Unidad de Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.4 Análisis bioestadístico

6.4.1 IBM SPSS Statistics

- Para el análisis bioestadístico se utilizó el paquete IBM SPSS Statistics versión 20 utilizando un diseño bifactorial al azar con la prueba de Tukey en todas las cinéticas de crecimiento y proteína comparando los datos de las cepas silvestres con la mutante correspondiente (FB1 vs. LP1 y FB2 vs. LP2). Además, para verificar las diferencias en el ensayo de infección de plantas de maíz, se realizó la prueba de Friedman en tamaño, presencia de antocianinas y clorosis, y tamaño de tumor; y para la localización de los tumores en la planta y en la diferencia en talla, se recurrió a una prueba de Wilcoxon.

VII. MÉTODOS

7.1 ETAPA I: Identificación de los componentes de la vía de sumoilación

7.1.1 Diseño de sondas aminoacídicas *in silico* para la búsqueda de los componentes de la vía de sumoilación

- Para la búsqueda de los componentes de la vía de sumoilación, SUMO, Aos1, Uba2, Ubc9, Siz1, Ulp1 y Ulp2, se diseñaron sondas aminoacídicas tomando las secuencias existentes en el National Center for Biotechnology Information (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de organismos relacionados. Las secuencias registradas fueron buscadas en Octubre del 2017 (Tabla 2).

Tabla 2. Sondas aminoacídicas. Organismos, números de acceso en el NCBI de las secuencias utilizadas y las sondas diseñadas para la identificación de los componentes de la vía de sumoilación.

COMPONENTE	ORGANISMO	ID	SONDA
SUMO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010798.1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_001342889.1	HINLKVTGDNNNEVFF KIKRTTKLRKLMDFC
	<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_658795.1	
	<i>Candida albicans</i>	XP_713803.1	
	<i>Neurospora crassa</i>	XP_011393283.1	
AOS1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDN61296.1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593251.1	DEIALYDRQIRLWGMT AQANLRSKILLINLGA LGNEITKNLVLSGIGSL
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	XP_018734750	TIL
	<i>Candida orthopsilopsis</i>	XP_003869097.1	
	<i>Neurospora crassa</i>	XP_011393987.1	
UBA2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AJU64459.1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_595945.1	SKVLLVGAGGIGCELL KDLILMGFGEIHVDLD TIDLNLNRQFLFRQKD
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_750939.1	IKQPKS
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	XP_022674896.1	

UBC9	<i>Candida albicans</i>	XP_717612.2	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010219.1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593204.1	WEGGLYKITVAFPEEY PTKPPKCKFPPPLFHPN VYPSGTVCLSILNEEED WKPAITLKQILLGIQDL
	<i>Candida orthopsilopsis</i>	XP_003869559.1	LDDP
	<i>Trichoderma harzianum</i>	XP_024777320.1	
SIZ1	<i>Fusarium oxysporum</i>	XP_018240801.1	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010697.3	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	XP_022675777.1	TTSTILSLQCPISYTRMK YPVKSIIHCDHLQCFDA LWFIESQLQIPTWQCPV
	<i>Candida albicans</i>	XP_718168.2	
	<i>Candida glabrata</i>	KTB22319.1	
ULP1	<i>Candida orthopsilopsis</i>	XP_003868178.1	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_015305.1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_595975.1	FNSFFYTTLSEYGYQGV RRWMKRKKVDIAKLD KIFIPVNLNDSH
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	XP_022674547.1	
	<i>Komagataella pastoris</i>	ANZ76143.1	
ULP2	<i>Candida glabrata</i>	KTB18811.1	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012233.1	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	XP_022676190.1	RQTHSRAIDPIKEFLISY AKDKYQIQIDKTLIKM KTCPVPPQPNFSDCGV
	<i>Candida glabrata</i>	KTB11630.1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593475.2	
	<i>Candida orthopsilopsis</i>	XP_003866031.1	

- Las secuencias de cada componente de los diferentes organismos se alinearon utilizando la herramienta BioEdit (Hall, 1999) usando el programa ClustalW y se generó una secuencia consenso de ~50aa, la cual se ingresó en BLASTp del NCBI delimitando contra el organismo *Ustilago maydis*. Con ayuda de la base de datos de dominios del NCBI y la plataforma Pfam (Finn *et al.*, 2016) se identificaron los dominios conservados presentes en cada secuencia aminoacídica de los componentes.

- Adicional a esto, se realizó un análisis del promotor del gen *SIZ1* de *U. maydis* tomando 2000pb río arriba del gen y se ingresó esta secuencia en la herramienta Yeabstract (Teixeira *et al.*, 2018 <http://www.yeabstract.com/>) en el apartado de búsqueda de sitios de unión para factores de transcripción.

7.2 ETAPAI: Generación de mutantes *Δsiz1*

7.2.1 Marcador de peso molecular Lambda PstI (λ -pstI)

- En un tubo estéril, se agregaron 50 μ L de ADN del fago λ (0.3 μ g/ μ L TaKaRa No. de catálogo 3010), además se agregó 1U/ μ L de enzima PstI (Promega No. de catálogo R6111) con 6 μ L de regulador H10X (Promega No. de catálogo R008A) y 6 μ L de albúmina de suero bovino (BSA) 10X. Se incubó por 3hrs a 37°C y al finalizar, se corrió en un gel de agarosa al 1% a 80V por 40mins para verificar el corte enzimático. Por último, se agregaron 0.75 μ L de EDTA 0.5M y 12.8 μ L de regulador de carga 5X (Green GoTaq® Flexi Regulador, Promega, No. de catálogo M891A).

7.2.2 Gel de electroforesis de agarosa al 1% (Sambrook y Russel, 2001)

- Para cada gel de agarosa empleado, se pesó 1gr de agarosa y se le añadió 100mL de regulador TBE 1X y esto se calentó hasta que la agarosa se homogenizó y se observaba cristalina. Se vertió en una cámara de electroforesis con un “peine” de pocillos y se deja polimerizar. Posteriormente se retiró el peine y se procedió a añadir las muestras utilizando 1 μ l de regulador “de corrida” 5x Green GoTaq® Flexi Regulador, 1 μ l de colorante GelRed™ 0.1X y 3 μ l de muestra. Se aplicó una corriente de 80V por 45mins y se observó el gel en un transiluminador.

7.2.3 Formación de protoplastos de *Ustilago maydis* (Método modificado de Tsukuda *et al.*, 1988)

- Para la formación de protoplastos se inocularon células de *U. maydis* en 5mL de MC como pre-inoculo y se incubó por 24 horas a 28°C. Al día siguiente, se inocularon 500µL de este pre-inoculo en 100mL de MC y se incubaron por 16hrs a 28°C. después de este tiempo, se midió la densidad óptica a 600nm hasta alcanzar de 0.6 a 0.8 de Absorbancia. Una vez alcanzada ésta, se centrifugaron las células a 2500rpm por 10mins y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 10mL de solución SCS fría y el volumen se llevó a 30mL con la misma solución. Se centrifugaron las células a 2500rpm por 10mins y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1mL de solución SCS y se añadieron 100mg de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma Aldrich No. de catálogo L1412-25G) y se incubó por 30mins a 28°C mezclando suavemente por inversión. Posteriormente se comprobó en el microscopio óptico la formación de los protoplastos y se centrifugaron a 1000rpm por 10mins. Se eliminó el sobrenadante y los protoplastos formados se resuspendieron nuevamente en 1mL de solución SCS. Las células se transfirieron a tubos de 1.5mL y se centrifugaron a 2000rpm por 5mins. Luego, se retiró el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 1mL de solución de SCS y se centrifugaron a 2000rpm por 5mins. Se retiró el sobrenadante con una micropipeta y los protoplastos se resuspendieron en 1mL de solución STC fría. Se centrifugaron a 2000rpm por 5mins y se resuspendieron en 930µL de solución STC y 70µL de dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich No. de catálogo 67-68-5). Para finalizar, se prepararon alícuotas de 50µL y se almacenaron en ultracongelación para su posterior uso.

7.2.4 Método de interrupción de genes por split - marker (Catlett *et al.*, 2003)

- Se prepararon reacciones de 25µL de PCR para cada fragmento requerido. El casete de interrupción utilizado para la transformación fue proporcionado por la Unidad de

Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, el cual contiene como marcador de selección el gen de resistencia a higromicina y está dirigido hacia el gen *SIZ1* (UM03696) (Rios-Holguín, 2017). Para el segmento de promotor y de resistencia a higromicina 5'(P – H), se agregaron 0.5µL de ADN molde, en este caso el casete de interrupción para *SIZ1*, 0.5µL del oligonucleótido anidado forward (10µM), 0.5µL del oligonucleótido de detección de resistencia a higromicina reverse (10µM), 2.5µL de regulador 10X, 1.25µL de MgSO₄ 2.5mM, 0.5µL de dNTP's 10mM, 1µL de enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 5U/µL (Thermo Fisher Scientific No. de catálogo 11304-029), y 18.25µL de agua miliQ. Para el fragmento de resistencia a higromicina y terminador 3' (H – T), se agregó 0.5µL de ADN molde, 0.5µL del oligonucleótido anidado reverse 10µM, 0.5µL del oligonucleótido de detección de resistencia a higromicina forward 10µM, 2.5µL de regulador 10X, 1.25µL de MgSO₄ 2.5mM, 0.5µL de dNTP's 10mM, 1µL de enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 5U/µL, y 18.25µL de agua miliQ (Figura 5). Las PCR's se llevaron a cabo en un termociclador BIO-RAD T100™ Thermal Cyclor (Tabla 3 y 4).



Figura 5. Interrupción de genes por Split – marker. Casete de interrupción utilizado como molde para la técnica de Split – marker donde se generan dos fragmentos, (P – H) amplificados por los oligonucleótidos 1, y (H – T) amplificados con los oligonucleótidos 2.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el método de Split-marker. Se incluyen las secuencias, T_m° utilizada y el tamaño del amplificado

NOMBRE	ID	SECUENCIA	T _m °	TAMAÑO
Anidado <i>forward</i>	9F-AniSiz #315	CAACGACCCCACTTCACCCT	54.18°	2458pb
Detección de higromicina <i>reverse</i>	5R-hygetec #311	GATTTGTGTACGCCCGACAG	53.33°	
Anidado <i>reverse</i>	9R-AniSiz #315	TTCCCTCTGTGCTCAACATGC	55.09°	2109pb
Detección de higromicina <i>forward</i>	5F-hygetec #311	CGAGAGCCTGACCTATTGCATC	57.17°	

Tabla 4. Programa de PCR utilizado para amplificar los fragmentos 5' y 3' de Split – marker.

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
94°C	2 mins	
94°C	45 seg	
54°C	30 seg	35X
72°C	3 mins	
72°C	5 mins	
4°C	∞	

7.2.5 Transformación de protoplastos de *Ustilago maydis* con ADN (Método modificado de Tsukuda *et al.*, 1988)

- En un tubo estéril, se mezclaron de 1 a 5µg de ADN transformante (obtenido por la técnica de Split – marker) con 1µL de heparina 15µg/µL (bioWORLD No. de catálogo 40800004-1) y se aforó a 5µL con solución STC. La reacción se mantuvo en hielo y se agregaron 50µL de protoplastos de *U. maydis* previamente formados y

se mezclaron suavemente con la micropipeta. Esto se mantuvo en hielo por 10mins y después de agregaron 500µL de polietilenglicol (PEG) 40% p/v en solución STC y se mezcló por inversión suavemente. Se incubó en hielo por 15mins y luego, se agregaron 500µL de solución STC y se mezcló por inversión suavemente. Se centrifugó a 2500rpm por 10mins y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió lentamente en 100µL de solución STC para posteriormente inocular en placas de DCM-S con 200µg/µL de Higromicina. Las placas se incubaron de 3 a 5 días a 28°C. Las colonias obtenidas se estrían en placas de MC con 200µg/µL de Higromicina (GOLD BIOTECHNOLOGY No. de catálogo H-270-5), las cuales se incuban a 28°C hasta obtener colonias aisladas; estas se crecieron en 5mL de MC y se les realizó extracción de ADN.

7.2.6 Extracción de ADN de organismos eucarióticos (Sambrook y Russel, 2001)

- Se inocularon las cepas de *U. maydis* en MC y se incubaron por 24 horas en agitación a 28°. Después, se tomaron 3mL de medio cultivo con células en crecimiento y se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 3,000rpm. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 500µL de regulador NTES y se resuspendió la pastilla celular en el vórtex. Se agregan 0.3g de perlas de vidrio estériles (Sigma LifeScience No. de catálogo G9018 150-212µm 70-100 U.S.S sieve) y se mezclan en vórtex por 15mins. Posteriormente, se centrifuga por 10mins a 14,000rpm y se recupera el sobrenadante en un tubo estéril nuevo. En éste, se agregan 400µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se mezcla en vórtex por 5mins. De nuevo se centrifugan los tubos por 10mins a 14,000rpm y se recupera la fase superior en un tubo nuevo. Para precipitar, se agregó 0.1 volúmen de acetato de amonio 7.5M y 2 volúmenes de etanol al 96% y se incubó a -20°C por un mínimo de 12 horas. Después de esto, se centrifugó a 14,000rpm por 20mins y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 200µL de etanol al 70% para lavar el concentrado celular y se mezcló en vórtex por 1min. Se centrifugó por 10mins a 13,500rpm y se retiró el sobrenadante obtenido y se evaporó el etanol restante en el Thermomixer®

a 65°C por 5 minutos. Por último, se resuspendió el concentrado celular en 50µL de regulador TE y se almacenaron a -20°C.

7.2.7 Comprobación de la mutación por PCR y restricción

- Se utilizaron diferentes métodos para la comprobación de la mutante: la presencia/ausencia del marco de lectura abierto del gen *siz1* y del marcador de selección de resistencia a higromicina, la diferencia de tamaño de amplificado entre la secuencia que contiene el gen *SIZ1* (4424pb) y el casete de interrupción (3891pb) con el uso de oligonucleótidos externos, y el corte con enzimas de restricción que contengan un sitio de corte en el casete de interrupción y no en el fragmento silvestre.

Se emplearon reacciones de 12.5µL que para amplificar el ORF de *siz1* contienen 0.5µL de ADN molde, 0.5µL de oligonucleótido *siz1* forward (10µM), 0.5µL de oligonucleótido *siz1* reverse (10µM), 2.5µL de regulador 10X, 1µL de enzima MyTaq™ DNA Polymerase 5U/µL (Bioline No. de catálogo BIO-21105), y 7.5µL de agua miliQ. Para observar la diferencia de tamaños de amplificado, se utilizan 0.5µL de ADN molde, 0.5µL de oligonucleótido promotor forward (10µM), 0.5µL de oligonucleótido terminador reverse (10µM), 2.5µL de regulador 10X, 1µL de enzima MyTaq™ DNA Polymerase 5U/µL, y 7.5µL de agua miliQ. Además, se detectó el gen de resistencia a higromicina para comprobar su presencia e inserción del casete de interrupción y para verificar la integridad del ADN extraído se amplificó el gen de actina, donde para ambos se usaron 0.5µL de ADN molde, 0.2µL de oligonucleótido actina y detección de resistencia a higromicina forward (10µM), 0.2µL de oligonucleótido actina y detección de resistencia a higromicina reverse (10µM), 2.5µL de regulador 10X, 1µL de enzima MyTaq™ DNA Polymerase 5U/µL (Bioline No. de catálogo BIO-21105), y 8.1µL de agua miliQ (Tabla 5). Las PCR's se llevaron a cabo en un termociclador BIO-RAD T100™ Thermal Cycler (Tabla 6 y 7).

Tabla 5. Oligonucleótidonucleótidos empleados para la comprobación de la mutación. Detección de presencia / ausencia del ORF de *siz1*, la diferencia en tamaños de amplificado, la detección del marcador de higromicina y el control de actina con sus respectivas secuencias, Tm° y tamaño del amplificado.

NOMBRE	ID	SECUENCIA	Tm°	TAMAÑO
<i>Siz1 forward</i>	10F-orfSIZ #318	CCACTTCAGATCGTTTCCACTTCC	56.38°	1087pb
<i>Siz1 reverse</i>	10R-orfSIZ #320	CGAGCTAATCTTGCCATCGGAG	58.49°	
Externo <i>forward</i>	fwtextSiz1 #	TGGAGGACGCAAGGATGTCG	56.51°	4044pb
Externo <i>reverse</i>	revextSiz1 #	AGTGTGGAAGCAGGTTGTCG	54.31°	
Detección de higromicina <i>forward</i>	5F-hygdtec #311	CGAGAGCCTGACCTATTGCATC	57.17°	676pb
Detección de higromicina <i>reverse</i>	5R-hygdtec #311	GATTTGTGTACGCCCGACAG	53.33°	
Actina <i>forward</i>	Actina-F #284	CTCBATCATGAAGTGTGA	50.0°	242pb
Actina <i>reverse</i>	Actina-R #284	BTGCTTYGARATCCACAT	50.0°	

Tabla 6. Programa de PCR utilizado para amplificar el ORF de *SIZ1* y el fragmento de externos

TEMPERATURA		TIEMPO		CICLOS
94°C		2 mins		
94°C		45 seg		
63°C ORF	54°C externos	30 seg		35X
72°C		2 mins ORF	5 mins externos	
72°C		5 mins		
4°C		∞		

Tabla 7. Programa de PCR utilizado para amplificar los controles de actina y detección de higromicina

TEMPERATURA		TIEMPO	CICLOS
94°C		2 mins	
94°C		45 seg	
54°C actina	57°C higromicina	30 seg	35X
72°C		1 min	
72°C		5 mins	
4°C		∞	

- Por último, se utilizó el programa SnapGene® Viewer 4.1.6 (GSL Biotech <http://www.snapgene.com/>) para seleccionar una enzima que corte en el casete de interrupción y no en el fragmento silvestre. Se utilizó la enzima EcoRI que tiene un solo sitio de corte y se tienen productos de 2,116pb y 1,775pb (Figura 6). Para la reacción se utilizó 2µL de regulador H 10X (Promega, No. de catálogo R008A), 2µL de BSA 10X, 5µL de ADN, 1µL de enzima EcoRI 12U/µL (Promega, No. de catálogo R601A), y 10µL de agua miliQ. Esta reacción se mantuvo a 37°C por 4 horas.

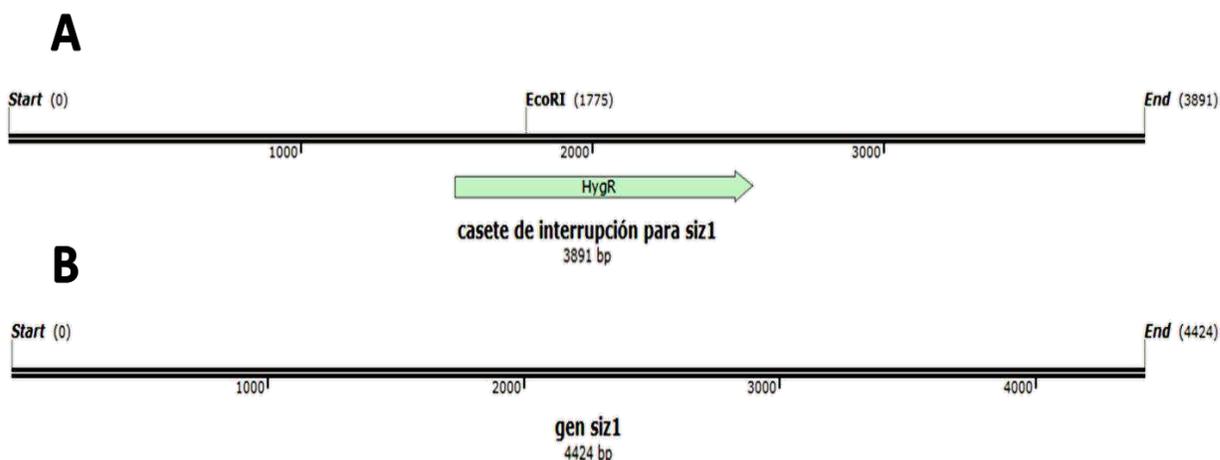


Figura 6. Enzimas de restricción utilizadas. Fragmentos que corresponden a (A) el casete de interrupción que mide 3891pb y que con la enzima EcoRI se obtienen productos de 2,116pb y 1,775pb; y (B) al fragmento silvestre del gen SIZ1 donde EcoRI no tiene sitio de corte.

7.3 ETAPA III: Caracterización fenotípica de la mutante

7.3.1 Curva de resistencia a higromicina

- Se prepararon placas de MC agar con concentraciones de 0 μ g/ μ L, 50 μ g/ μ L, 100 μ g/ μ L, 150 μ g/ μ L, 200 μ g/ μ L, 250 μ g/ μ L, 300 μ g/ μ L, 350 μ g/ μ L, 400 μ g/ μ L, 450 μ g/ μ L y 500 μ g/ μ L de higromicina y se inocularon las cepas de *U. maydis* silvestres FB1 y FB2, las cepas mutantes LP1 y LP2, y un control positivo resistente a higromicina para observar el crecimiento en comparación con las cepas silvestres, y las concentraciones mínimas inhibitorias de las mutantes.

7.3.2 Cinética de crecimiento

- Se determinó la cinética de crecimiento en MM pH 4, MM pH 7 y MM pH 9 midiendo la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro BioMate3 Thermo Electron Corporatio. Además, las células se trataron con NaOH 1N y se dejaron reposar al menos 24 horas a temperatura ambiente para la medición de proteína a 595nm. Las lecturas se realizaron a las 0, 8, 12, 24, 36 y 48hrs y las células de los tiempos 0, 24 y 48, se tiñeron con blanco de calcofluor y DAPI y se observaron en el microscopio de fluorescencia LEICA DMRE MICROSCOPE. Por último, se midió el pH del medio en un potenciómetro. En este experimento, el pH de los medios no fue controlado con regulador para poder observar si existía un cambio en éste.

7.3.3 Tinción con blanco de calcofluor

- En la tinción con blanco de calcofluor se pretende teñir la quitina de la pared celular de los hongos, por lo que se empleó blanco de calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich No. de catálogo 18909) y se utilizó el protocolo descrito por la compañía,

donde se agrega una gota de éste en la muestra previamente colocada en un portaobjetos limpio. Para mejorar la visualización de la tinción se agregó una gota de hidróxido de potasio 10%. Se cubrió con un cubreobjetos y se dejó reposar por 1 min. Finalmente, las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia LEICA DMRE MICROSCOPE a una longitud de onda de 355nm con el objetivo 100X.

7.3.4 Tinción con DAPI

- El 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) utilizado para teñir el ADN, fue de la compañía Thermo Fisher scientific (No. de catálogo D1306) al igual que la metodología para su preparación y uso. Se preparó una solución con 2mL de agua desionizada estéril (5mg/mL) y se almacenó a -20°C. Para preparar las muestras, se agregaron 2.1µL de esta solución a 100µL de regulador fosfato salino (PBS) para tener una solución 300µM. Después, se diluyó la solución 300µM a 1:1000 en PBS, para llegar a 300nM. Posteriormente, la muestra se fijó en un portaobjetos limpio y se realizaron tres lavados con PBS a las células, de aquí se añadió suficiente DAPI 300nM hasta cubrir las células. Se incubaron 5 mins en obscuridad y al finalizar se removió la solución de DAPI. De nuevo, se lavaron las células tres veces con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia LEICA DMRE MICROSCOPE a una longitud de onda de 358nm/461nm con un objetivo 100X.
- Para analizar la susceptibilidad de las mutantes a diferentes tipos de estrés, los tratamientos se llevaron a cabo tanto en medio sólido como líquido. Para el medio sólido, se tomaron 10^7 células de las cepas silvestres FB1 y FB2, y de las mutantes LP1 y LP2 y se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-4} las cuales se inocularon por goteo en los diferentes medios sólidos. Las placas se mantuvieron a 30°C (a excepción del estrés por temperatura), y fueron examinadas después de 48hrs. En medio líquido se

inocularon 10^6 células por mililitro de medio, y de igual manera se incubaron a 30°C y en agitación a 150rpm, se tiñeron con blanco de calcofluor y se observaron a las 48hrs en un microscopio de fluorescencia LEICA DMRE MICROSCOPE. Como control, se realizó el tratamiento en MC. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

7.3.5 Estrés por temperatura

- En MM pH 7 se inocularon las células de *U. maydis* y se incubaron a tres diferentes temperaturas que son: 20°C , 30°C y 37°C .

7.3.6 Estrés por pH

- Se preparó MM de pH 3, pH 7 y pH 9 para el tratamiento en medio líquido y placas de MM pH 4, pH 7 y pH 9 sólido. El pH se controló con regulador para evitar cambios abruptos del pH con el paso del tiempo.

7.3.7 Estrés por choque iónico y osmótico

- Para determinar la tolerancia al estrés osmótico, se prepararon placas de MM con agar y medio líquido MM pH 7 y se le agregó una concentración de NaCl 1M, KCl 1M y LiCl 10mM que se agregaron al MM pH 7 por separado.

7.3.8 Estrés sobre la pared celular

- Se preparó MM pH 7 y se les adicionaron cuatro compuestos diferentes para estresar o desestabilizar la pared celular del hongo, que fueron rojo congo $10\mu\text{g/mL}$, blanco de calcofluor $20\mu\text{g/mL}$, sorbitol 1M o 2% de etanol.

7.3.9 Estrés oxidativo

- Para observar el estrés por agentes oxidativos, las placas y el medio líquido de MM pH 7 fueron suplementadas con rosa de bengala 10mM y se evaluó el choque por H₂O₂ incubando por dos horas en PBS con H₂O₂ 0.8mM. Las células de *U. maydis* se centrifugaron a 3,000rpm por 10 mins y se lavaron con agua destilada estéril dos veces, por último, las células se inocularon en MM pH7.

7.3.10 Estrés por radiación UV

- Las células de *U. maydis*, se irradiaron con 500μJ/cm² en un Stratalinker® y se incubaron igual que los demás tratamientos.

7.3.11 Inducción de la transición dimórfica por pH o fuentes de carbono (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995; Klose *et al.*, 2004)

- La inducción de la diferenciación de levadura a micelio se puede dar en condiciones de pH 3. Para esto, se preparó un inóculo en 15mL de MC de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2, las cuales se incubaron por 48hrs a 30°C y se transfirió este inóculo a un volumen de 150mL de MC y se dejó incubando por 24hrs a 30°C. Se centrifugaron las células y se lavaron 2 veces por centrifugación con agua destilada estéril y se inocularon en 150mL de agua destilada estéril y se dejaron en agitación por 4 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron 2 veces por centrifugación con agua destilada estéril y se recuperaron en agua destilada estéril en un 10% de su volumen original y se dejaron reposar en hielo por 15mins. Posteriormente, se inocularon en MM pH3 y en MM pH7, se incubaron a 30°C por 48hrs y se observaron en un microscopio de fluorescencia LEICA DMRE MICROSCOPE después de teñirlas con blanco de calcofluor.

- La diferenciación también se ha observado usando diferentes fuentes de carbono como Tween-40 1%, que contiene palmitato, o acetato de sodio, por ellos se prepararon pre-inoculos en 15mL de MC de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 y se incubaron por 48hrs a 30°C y se re-inocularon en 50mL de MC y se crecieron por 24hrs a 30°C. posteriormente se inocularon 10⁶ células por mililitro en un medio MM pH 7 con Tween-40 al 1% y otro con acetato de sodio al 1%. Las células adicionadas con acetato de sodio 1% fueron teñidas con blanco de calcofluor y observadas al microscopio de fluorescencia LEICA DMRE MICROSCOPE a las 48hrs, mientras que las células en el medio con Tween-40 1%, se observaron hasta los cinco días. En ambos casos, también se sembraron las células en MM pH7 con glucosa como única fuente de carbono como controles que se incubaron y analizaron en las mismas condiciones que las células incubadas con Tween-40 o acetato de sodio.

7.3.12 Determinación del apareamiento por la técnica Fuzz (Banuett y Herskowitz, 1989)

- Para determinar las mutaciones en el gen *SIZ1* afectaban en su capacidad de apareamiento, se realizó la técnica Fuzz descrita por Banuett y Herskowitz (1989). Se prepararon placas con MM pH 7 sólido agregándole de carbón activado al 1%. Posteriormente, a partir de un cultivo con 10⁵ cels/mL, se colocaron 5µl de cada cepa por separado en las placas y en seguida, se colocaron 5µL de la suspensión de células del tipo sexual complementario para observar el apareamiento. Se realizaron las siguientes combinaciones: FB2 x FB2, FB2 x FB1, FB1 x FB1, FB2 x LP1, LP1 x LP1, LP2 x LP2, LP2 x FB1 y LP2 x LP1. Después de 48hrs a temperatura ambiente, se confirmó el apareamiento, observándose el desarrollo o no de colonias blancas y algodonosas (miceliales) que indican una reacción positiva de apareamiento, o en ausencia de apareamiento, colonias cremosas y brillantes (levaduriformes).

7.3.13 Capacidad de infección en plantas de maíz

- Se tomaron 100 semillas de maíz proporcionadas por el Laboratorio de Diferenciación y Desarrollo de Hongos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) unidad Irapuato, se lavaron con hipoclorito de sodio al 20% y posteriormente con de etanol al 20% por 20mins, y se dejaron en agua destilada toda la noche. Posteriormente se dejaron germinar en una cama de algodón húmedo. Al momento de observar un brote de ~3 – 5cm, se sembraron grupos de 5 semillas en 25 macetas a 5cm de profundidad. Aunado a esto, se inocularon 100mL de MC líquido de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 y se incubaron a 30°C por 48hrs y transcurrido este tiempo, se mezclaron en cantidades iguales generando las siguientes mezclas de células: FB1 x FB2, LP1 x LP2, FB1 x LP2 y FB2 x LP1. Al observar un crecimiento de las plantas de ~10cm, se inocularon con una jeringa y aguja, cada una con una mezcla de células (10^7 células/mL) y se adicionó un control al que se le inyectó agua estéril, y se dejaron en condiciones controladas de invernadero regándolas cada 3 días. Después de 10 días de crecimiento se anotaron los siguientes parámetros: tamaño en cm, la presencia de antocianinas y clorosis, tamaño y localización de tumores, y la talla de la planta.

VIII. RESULTADOS

8.1 ETAPA I. Identificación de los componentes de la vía de sumoilación

8.1.1 Diseño de sondas aminoacídicas *in silico* para la búsqueda de los componentes de la vía de sumoilación

- Para comprobar la existencia de los componentes de la maquinaria de sumoilación en *U. maydis*, se diseñaron *in silico* sondas aminoacídicas alineando secuencias homólogas pertenecientes a cada componente reportadas en otros hongos en la base de datos del NCBI. Las sondas fueron dirigidas a dominios conservados presentes en cada uno de los componentes. En la mayoría de los casos, se encontró un porcentaje de identidad menor al 80% (Tabla 8); solamente Ubc9 contenía un 82% de identidad con la sonda diseñada.

Tabla 8. Componentes de la vía de sumoilación encontrados en *U. maydis*.

COMPONENTE	IDENTIDAD	ID	NCBI
SUMO	56%	UMAG_05863	XP_011392223.1
Aos1	64%	UMAG_01081	XP_011387042.1
Uba2	77%	UMAG_01001	XP_011386983.1
Ubc9	82%	UMAG_04542	XP_011390864.1
Siz1	47%	UMAG_03693	XP_011390170.1
Ulp1	45%	UMAG_00354	XP_011386246.1
Ulp2	75%	UMAG_10103	XP_011386660.1

- Estos datos muestran que homólogos de los seis componentes de la vía de sumoilación están presentes en *U. maydis*. A continuación, se analizó la presencia de los dominios funcionales conservados presentes en cada uno de ellos (Figura 7). Se observó que la proteína SUMO contiene el dominio de la familia de proteínas

Ubiquitin – like y dominios característicos de SUMO. Aos1 y Uba2 que forman un heterodímero, son parte de la familia de enzimas activadoras E1 y además, contienen un dominio ThiF que les ayuda a interactuar con E2 y a utilizar ATP para la activación de SUMO. Para Ubc9, que tuvo el mayor porcentaje de identidad, se encontró que pertenece a la familia de las proteínas UBCc y contiene un dominio de las proteínas conjugadoras E2 que se encargan de encontrar el motivo conservado en la proteína blanco y que es fundamental para llevar a cabo la modificación. En el caso de E3 Siz1 se encontró el dominio SP-RING que es característico de este tipo de enzimas. Por último, las enzimas Ulp1 y Ulp2 cuya función es proteolizar la unión de SUMO con la proteína blanco, contienen su dominio de peptidasa C48 y pertenecen a la familia de las proteínas ULP1. Se encontró que Ulp1 contiene su sitio activo hacia el extremo C-terminal, mientras que Ulp2, hacia el N-terminal.

SUMO

<i>S. cerevisiae</i>	HINLKVSD-GSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFARQGGKEMDSLRFLYDGIIRIQADQTPEDL
<i>S. pombe</i>	HINLKVVGQDNNEVFFKIKKTEFSLMKIYCARQGGKSMNSLRFLVDGERIRPDQTPAEL
<i>A. nidulans</i>	HLNIKVTD-NNNEVFFKIKRTTTLKLMDAFCDRQGGKQPSTVRFVFDGTRVREPDTPTL
<i>C. albicans</i>	HINVKVSD-GTQEVFFKVKRNTKFRRLMEAFARQGGTSPDTMRFLVDGGRVHADQTPEDL
<i>N. Crassa</i>	HLNIKVTD-NNNEVFFKIKRSTKLEKLMTAFRCRQGGKTLASVRFVFEGRVQPTDTPDTL
<i>U. Maydis</i>	CLNIKVKDADGNEVFFKVKRTTKLSKLRKAYAERMGKPEMSVRFIFDGRIGDNDTAETL

DOMINIOS
CONSERVADOS



AOS1

<i>S. cerevisiae</i>	MRSKAVLLINLGAIGSEITKSIIVLSGIGHLTILDGHMVT-EEDLGSQFFIGSED--VGQW
<i>S. pombe</i>	LKQSRVLLITASPLANEIAKNLVLSGIGKLCVLDSTVY-EKDVVEEQFFIEASD--IGQL
<i>S. lignohabitans</i>	MRNSKILVIGVSAATNEVVKNLVLAGVGSILTILDEKEVR-ARDLGAQFFIDETD--VGKK
<i>C. orthopsilopsis</i>	LRSTKILVINLGAAGTECVKNLVLGGLNSIEILDSDSVK-EEDFTAQFFLPNDSDSTVQKL
<i>N. crassa</i>	IRSANILLITMKALANEIAKNLVLAGIGSLTINDHAVVS-EADLGAQFFLSAEDGHLGQN
<i>U. maydis</i>	LRCAHILILGWNGIATEIILKNTVLSGIGSITILDPTCIDGSVDLLSGFFFRDEE--VGQF

DOMINIOS
CONSERVADOS



UBA2

S. cerevisiae LLVGAGGGIGSELLKDIILMEFGEIHIIVDLDTIDLSNLNRQFLFRQKDIKQPKSTTAVKAV
S. pombe LLVGAGGGIGCELLKKNLLMSGVKEVHIIDLDTIDLSNLNRQFLFRKKHVQPKAIVAAKTA
A. fumigatus LLVGAGGGIGCELLKKNLLSGFGEIHIIDLDTIDLSNLNRQFLFRYEHIKKPKALVAKEVA
K. marxianus LLVGAGGGIGCELLKDLILLEFGEIHIIVDLDTIDLSNLNRQFLFRQKDIKQPKSVTAVKAV
C. albicans LMVGAGGGIGCELLKDLVLTGYGEIHIIVDLDTVTLNLRQFLFRQKDIKSKSETIASAV
U. maydis LVVGAGGGIGCELLKNLVLTFEGNIEIIDLDTIDLSNLNRQFLFCQKHKKPKSLVAKQTA

DOMINIOS **ThiF**
CONSERVADOS **E1 enzyme family**

UBC9

S. cerevisiae GGVPITVEYFNEYPSPKPPKVKFPAGFYHPNVYPSGTICLSILNEDQDWRPAITIKQIVL
S. pombe GGlyKLTMAFFPEEYPTRPKCRFTPLFHPNVYPSGTVCLSilNEEEGWKPAITIKQILL
C. orthopsilopsis GGVPPIRLDFPEEYPSKPPRVKFPAGFYHPNVYPSGTVCLSilNEEQDWKPAITIRQIVL
T. harzianum GGLFKINIAFFDEYPTKPPKCKFVPLFHPNVYPSGTVCLSilNEEEAWKPAITVKQILL
K. oxysporum GGLFKLTIAFFDEYPTKPPKCKFVPLFHPNVYPSGTVCLSilNEEEAWKPAITVKQILL
U. maydis GGlyKLRMIFFPEEYPSKPPKCKFTPLFHPNVFPSGTVCLSilDEDKGWKPAITIKQILL

DOMINIOS **Conjugating enzyme E2**
CONSERVADOS **UBCc family**

SIZ1

S. cerevisiae TTSTIMSLQCFISYTRMKYPSKSNCRHLQCFDALWFLHSQIQIPTWQCPVCCIDIALEN
K. marxianus TTSTVMSLQCFISYSRMKYPVKSIHCRHLQCFDAQWFIESQKQIPTWQCPVCCQTIHIED
C. albicans IQTTKLPRLRDFLSYTKLANPTKSVHODHYMCFNGMLFIEQQLVDEWKCPVCSREIKFED
C. glabrata TTSTIISLQCFISYTRMSYPVRSKYCEHLQCFDGLWFLHSQIQVPTWMCVCCISLKPAD
C. orthopsilopsis IEDIILSLRDHYTYTKIEIPVKTINCDHLQCFDLRICMTQCYESPTWQCPHCRSRFEVSD
U. maydis QGAATMSLQCFESYMRITTPCRSVNCLHVQCFDAYSFSSINEQTPSWACPVCCQTIKPED

DOMINIOS **SP-RING**
CONSERVADOS **RING_Ubox family**

ULP1

S. cerevisiae PNTVAFNSFFYTNLSERGYQGVRRWMKRKKTCIDKLDKIFTPINLNQSHWALGIIDLKKK
S. pombe PRVHGfNTFFYTSLQRRGYAGVRRWAKKARVNIADMDAVFIPVHL-DVHWCMaVINKSKK
K. marxianus PKTVAFNSFFYSTLANRGYQGVRRWMKRKKVDILDLEIFIPVNLNDSHWTLGIIDIKNK
K. pastoris PSVFAFTTHFYTTFTSRGYDSVKRWAKRRKVDITKLDYVFPINILNSHWALGVIDNKRK
C. glabrata ANIVAFNSFFYTTLSERGYQGVRRWMKRKKKCIaKLDKIFVFNLNQSHWALGMIDIENK
U. maydis WRVHEFFSFFWTNLKNGKFDGVRWTRR--IDIESKDIILFPINLGNRHWWCGAINMRKH

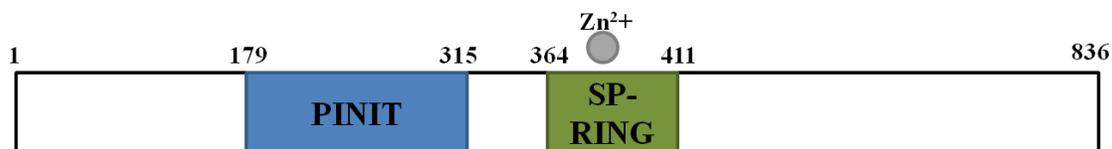
DOMINIOS **Peptidase C48**
CONSERVADOS **ULP1 family**

ULP2



Figura 7. Alineamiento *in silico* de los componentes de la vía de sumoilación. Usando la herramienta BioEdit se alinearon las secuencias homólogas de los componentes de la vía de sumoilación junto con la secuencia encontrada en *U. maydis* y los dominios conservados presentes en las proteínas de las diferentes especies.

- Con ayuda de la base de datos del NCBI y la herramienta Pfam, se analizó la secuencia aminoacídica completa de Siz1 de *U. maydis* que es de 836aa. Resaltan dos dominios principales en esta secuencia que son el dominio PINIT (179aa – 315aa), y el dominio SP-RING (364aa – 411aa) que es más pequeño. Este dominio tiene un sitio de unión para un ión zinc esencial para su función (Figura 8).



Siz1

Figura 8. Dominios presentes en Siz1 de *U. maydis*. Se observa el dominio PINIT y el dominio SP-RING que contiene un sitio de unión a un ión Zn²⁺.

- Además de estos ensayos *in silico*, se realizó un análisis del promotor del gen *SIZ1* de *U. maydis* para tener una mejor perspectiva de los procesos en los que puede estar involucrado. En la herramienta Yeastract se introdujo la secuencia del promotor de *SIZ1* y nos arrojó una extensa lista de factores de transcripción que pueden estar interactuando con el promotor, junto con el motivo que reconoce y el sitio en pares de base (Tabla 9). Se encontraron 37 factores de transcripción que posiblemente pueden estar interactuando con el promotor de *SIZ1* en un momento

dado. Para algunos solo existe una secuencia canónica de reconocimiento, a diferencia del factor Gcr1p que reconoce 23 sitios en el promotor.

- La mayoría de estos factores están involucrados en procesos celulares generales como la glicólisis, traducción y ciclo celular. Interesantemente, se encontraron factores implicados en la respuesta a estrés y otros procesos más específicos, como Tec1 en la formación de filamentos, Yap1 en el estrés oxidativo, Mot3 con hipoxia y calor, Nrg1 con la respuesta a estrés iónico y pH, Hsf1 con el choque térmico y Swi4 que participa durante la citocinesis.

Tabla 9. Factores de transcripción que se unen al promotor de SIZ1. Factores de transcripción y el número de sitios que reconoce en el promotor de *siz1* de *U. maydis*

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	NÚMERO DE SITIOS DE RECONOCIMIENTO
Ace2p	2
Adr1p	4
Aft2p / Aft1p	1 / 1
Ash1p	4
Bas1p	1
Crz1p	1
Cup2p	2
Ecm22p	1
Fkh1p / Fkh2p	1 / 1
Gcn4p	2
Gcr1p	23
Gsm1p	1
Hac1p	9
Haa1p	4
Hsf1p	4
Ime1p	1
Mcm1p	2

Mot3p	11
Nrg1	3
Pdr1p / Pdr3p	1 / 1
Pho4p	1
Rgt1p	4
Rtg1p / Rtg3p	5
Skn7p	2
Stb5p	22
Ste12p	1
Stp2p	1
Swi4p / Swi5p	1 / 2
Tec1p	1
Upc2p	2
Xbp1p	10
Yap1p	3

8.2 ETAPA II. Generación de mutante Δ siz1

8.2.1 Método de interrupción de genes por split – marker (Catlett *et al.*, 2003)

- Para generar la mutante de *siz1* interrumpiendo este gen, se tomó el casete de interrupción para *SIZ1* (Rios-Holguín, 2017) (Figura 9), y se le realizó la técnica de split – marker (Figura 10).

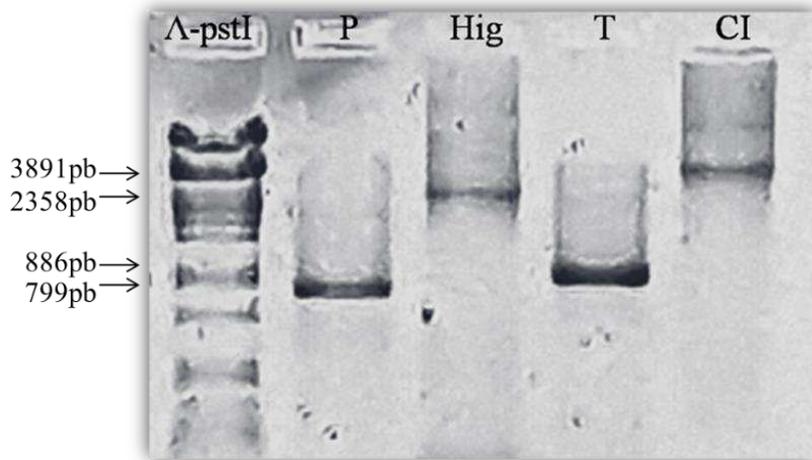


Figura 9. Casete de interrupción. Diseñado con la técnica de PCR de Doble Unión, el casete contiene el promotor (P) de *SIZ1*, el gen de resistencia a higromicina (Hig), y el terminador (T) de *SIZ1* con tamaños de 799pb, 2358pb y 886pb respectivamente. Al fusionar estos tres elementos se obtiene el casete de interrupción para *siz1* (CI) con un tamaño de 3891pb.

- Los dos fragmentos obtenidos por Split – marker fueron los que se utilizaron para transformar los protoplastos de *U. maydis* y obtener la mutante de *SIZ1* en las cepas FB1 y FB2 de *U. maydis*. Las colonias resultantes de la transformación fueron sembradas en placas de MC agar con 200µg/mL de higromicina y las que presentaron mayor crecimiento fueron inoculadas en MC líquido para la posterior extracción de ADN (Figura 11). La eficiencia de transformación obtenida fue de 2 colonias mutantes en 40 colonias analizadas. Las mutantes obtenidas fueron llamadas LP1 de la cepa con FB1, y LP2 de la cepa FB2.

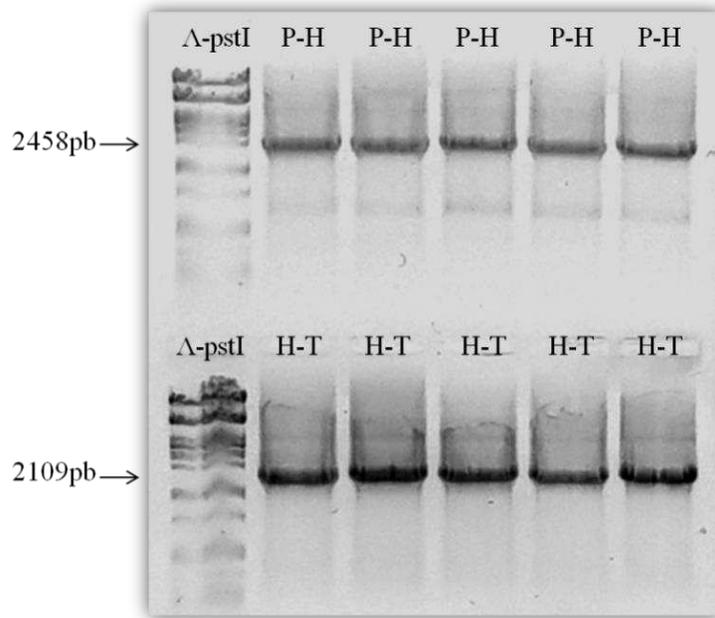


Figura 10. Fragmentos de PCR 5' y 3' para la transformación. Productos de PCR obtenidos con el método de Split marker que pertenecen al fragmento 5' de promotor e higromicina (P-H) con un tamaño de 2458pb y el fragmento 3' de higromicina y terminador (H-T) de 2109pb.

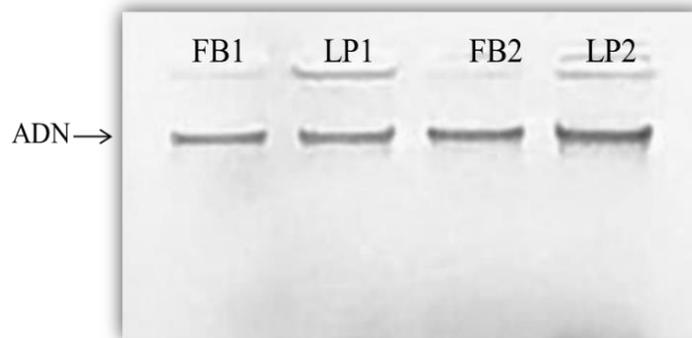


Figura 11. ADN de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2. Extracción de ADN perteneciente a las cepas silvestres FB2 y FB2 y a las mutantes obtenidas LP1 y LP2.

8.2.2 Comprobación de la mutación por PCR y restricción

- El primer método por el que se comprobó la mutante, fue la amplificación del ORF de *SIZ1*. En FB2 y FB1 se observa un amplificado de 1087pb que corresponde al ORF de *SIZ1*, mientras que en las mutantes LP1 y LP2 no se observan amplificados

(Figura 12), lo que nos quiere decir que posiblemente el casete de interrupción se insertó en el sitio correcto.

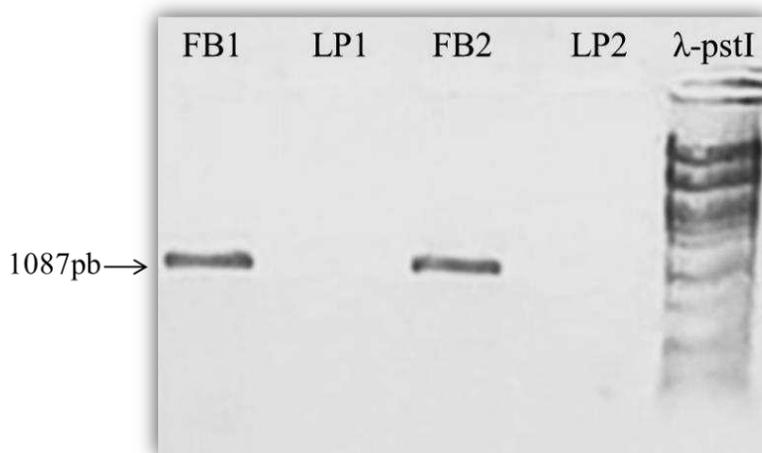


Figura 12. Presencia/ausencia del ORF de *SIZ1*. Se muestra la existencia del ORF de *siz1* en FB1 y FB2, mientras que en LP1 y LP2, no existe un amplificado.

- La diferencia de tamaños de amplificado es otro método indicativo para comprobar la mutación y que el casete fue incorporado en el sitio correcto. Al amplificar con oligonucleótidos externos (Tabla 5) en las cepas silvestres, obtenemos un amplificado de 4424pb, mientras que, si existe la mutación, el amplificado es de 3891pb (Figura 13). Esta diferencia se observó en las colonias que anteriormente no habían amplificado el ORF de *SIZ1*. Además, se comprobó la existencia del gen de resistencia a higromicina con oligonucleótidos de detección (Tabla 5) donde en FB1 y FB2 no está presente, y en las mutantes LP1 y LP2 si existe, mostrando un amplificado de 676pb (Figura 14). Para verificar la integridad y calidad del ADN extraído, se amplificó el gen de actina como control, que tiene un tamaño de 242pb, donde actina amplificó en todas las muestras (figura 15).

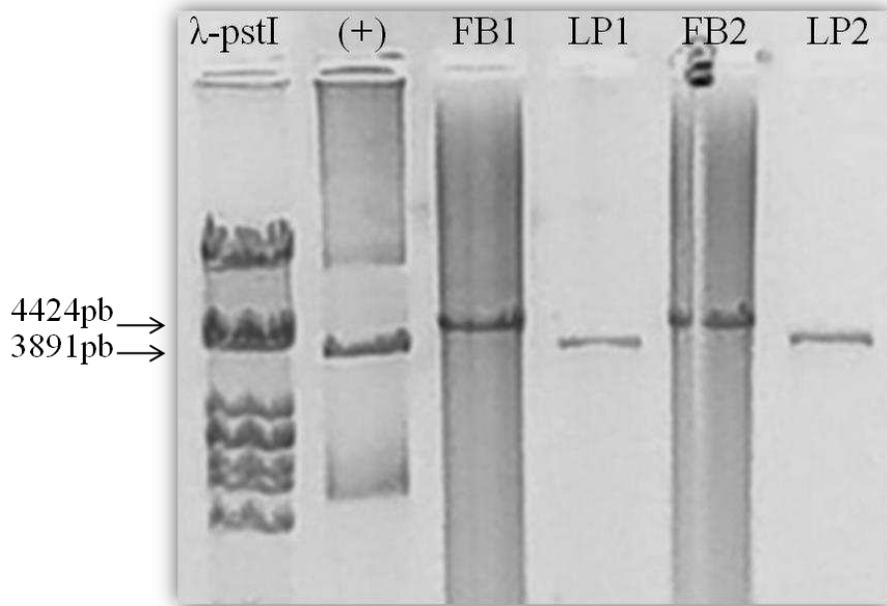


Figura 13. Diferencia de tamaño de los fragmentos silvestres y mutantes. Comprobación por diferencia de tamaños, el control positivo (+) es el casete de interrupción sin transformar que tiene un tamaño de 3891pb, en FB2 y FB1 se observa un fragmento de 4424pb que corresponde al silvestre, y LP1 y LP2 amplifica 3891pb que es del tamaño al casete de interrupción y que corresponde a las mutantes.

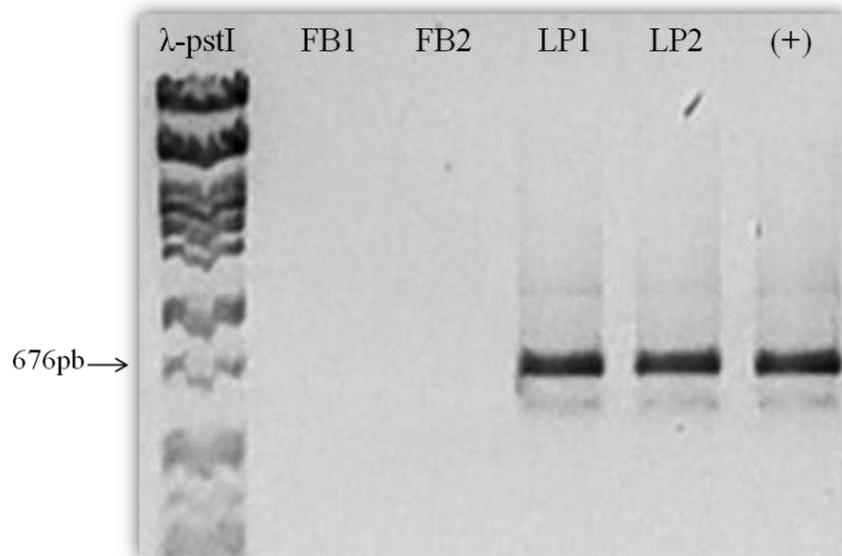


Figura 14. Detección del gen de resistencia a higromicina. Detección del gen de resistencia a higromicina que en FB1 y FB2 está ausente, en LP1 y LP2 se encuentra presente con un amplificado de 676pb, y por último el control positivo (+) es la detección del gen de higromicina directamente del casete de interrupción.

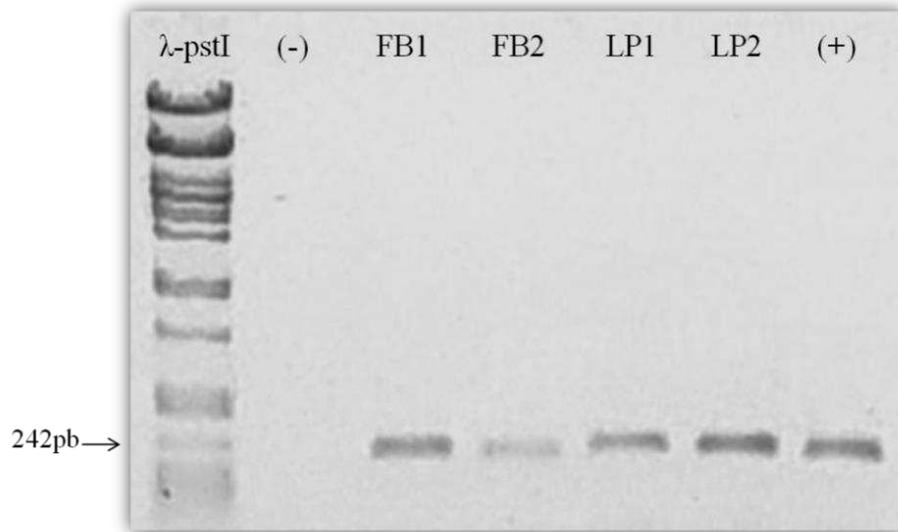


Figura 15. Control de actina. Amplificados de 242pb para FB1, FB2, LP1, LP2 y el control positivo (+), y un control negativo (-) que no contiene ADN, lo que indica una buena calidad de los ADN extraídos.

- El último paso para la comprobación de las mutantes fue cortar con la enzima de restricción EcoRI que tiene un solo corte en el casete de interrupción, dando productos de 2116pb y 1775pb (Figura 16). El fragmento silvestre con el gen *siz1* y los fragmentos que contienen el casete de interrupción en las mutantes, fueron cortados con EcoRI por 4hrs. El resultado obtenido revela que, en las mutantes, LP1 y LP2, existe un corte enzimático dando los productos deseados, mientras que con el fragmento silvestre de FB1 y FB2, no existe corte en ningún sitio. Con esto se puede asegurar que se obtuvieron mutantes carentes del gen *SIZ1* en de *U. maydis*.

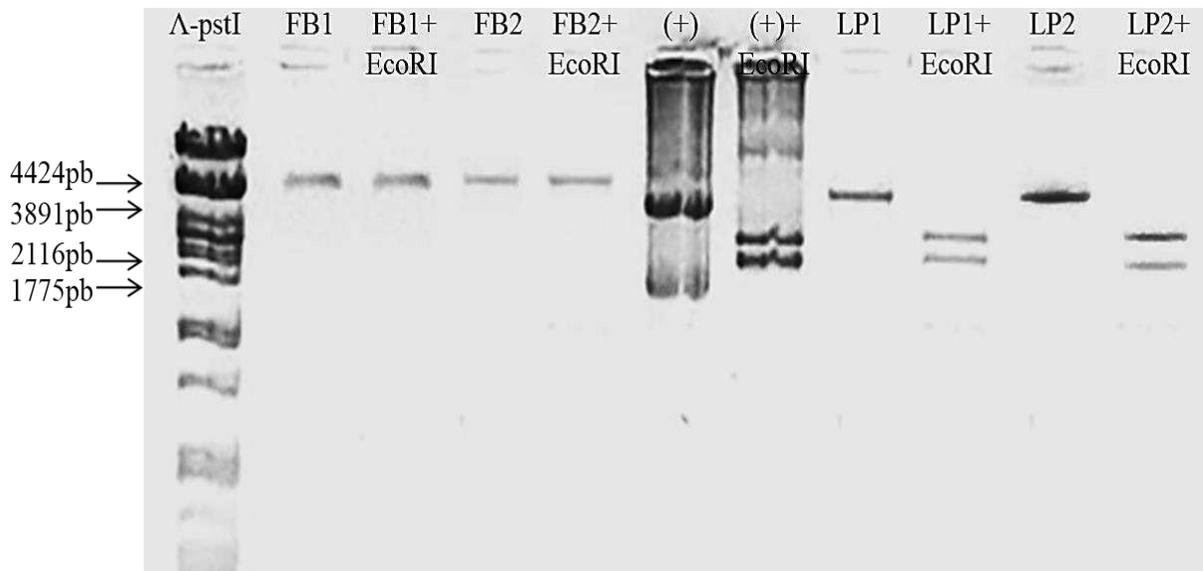


Figura 16. Comprobación de la mutante por cortes enzimáticos. Comprobación con la enzima EcoRI que en las mutantes LP1 y LP2 corta dando productos de 2,116pb y 1,775pb en cada una, y en FB1 y FB2 no existe corte. Se muestran los fragmentos sin cortar (FB1, FB2, LP1 y LP2) y los fragmentos expuestos a la enzima de restricción (FB1+EcoRI, FB2+EcoRI, LP1+EcoRI y LP2+EcoRI), además del control positivo que es el casete de interrupción para *SIZ1* (+) y el corte enzimático de este por EcoRI ((+)+EcoRI).

8.3 ETAPA III. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes

Crecimiento

8.3.1 Curva de resistencia a higromicina

- Durante la caracterización de las mutantes, se determinó la resistencia a higromicina comparando contra un control positivo (+) y negativos (FB1 y FB2). Para determinar la concentración de higromicina que resisten, se midió el crecimiento de las cinco cepas en placas de medio con concentraciones crecientes de higromicina. Se observó que a concentraciones mayores de 50µg/mL, las cepas FB1 y FB2 no mostraban un crecimiento considerable, mientras que las mutantes LP1 y LP2 mostraban un crecimiento similar al control positivo (+) hasta una concentración de 500µg/mL (Figura 17).

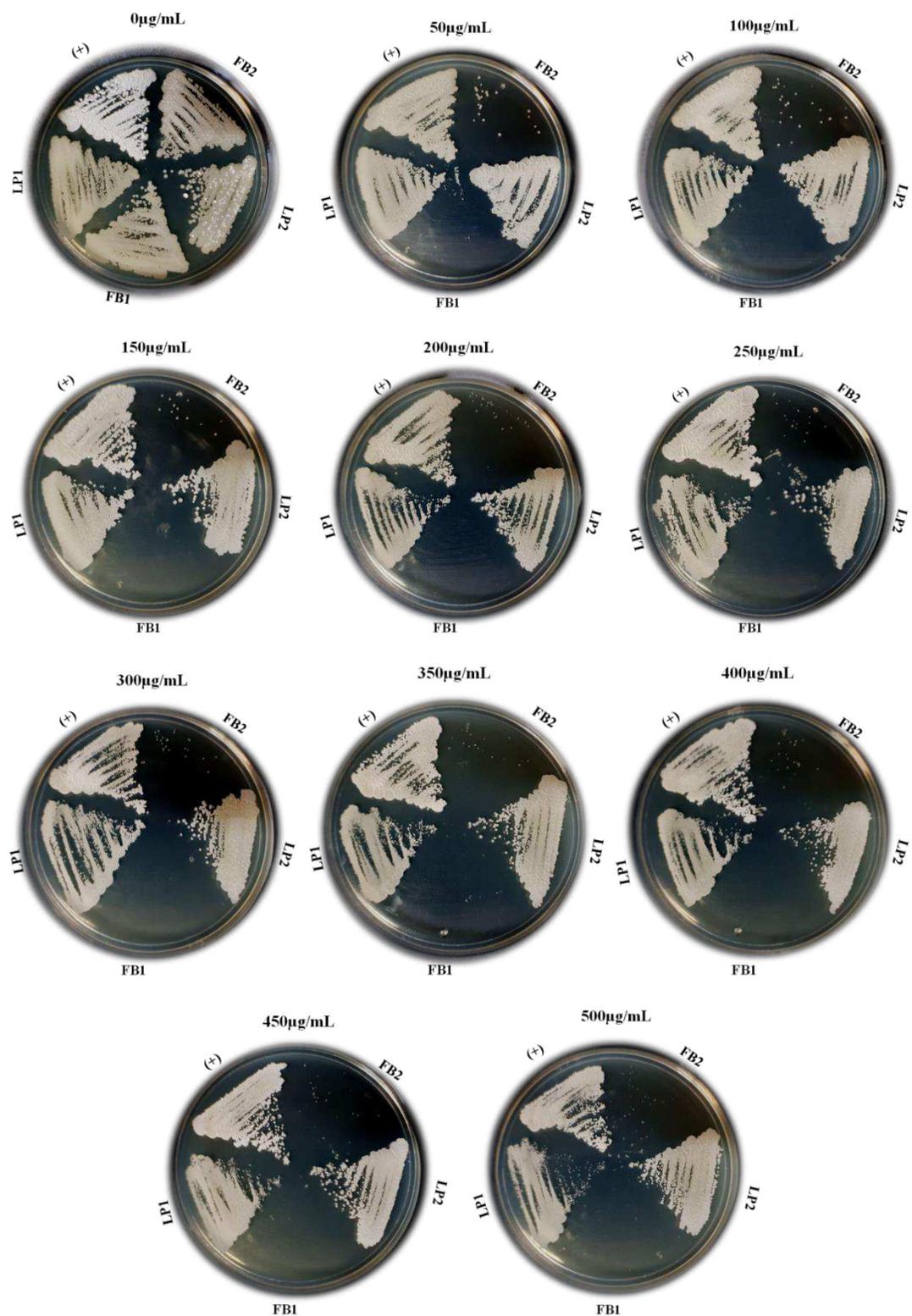
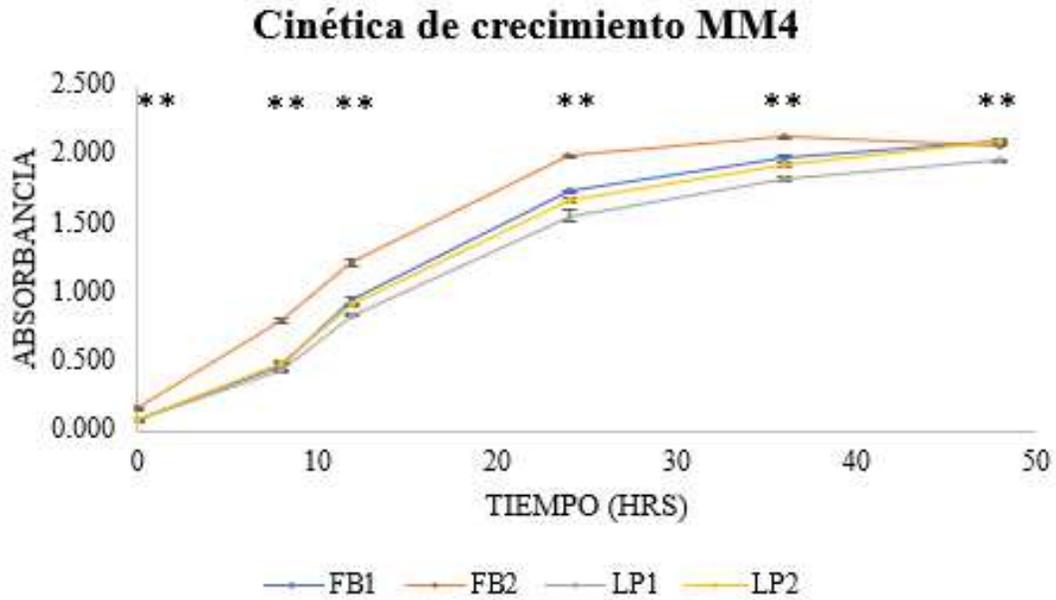


Figura 17. Resistencia a higromicina de cepas silvestres y mutantes. Las concentraciones utilizadas en la curva de resistencia van de 0µg/mL hasta 500µg/mL. Se tiene un control positivo (+), FB1 y FB2 son controles negativos, y LP1 y LP2 son las mutantes que contienen resistencia a higromicina.

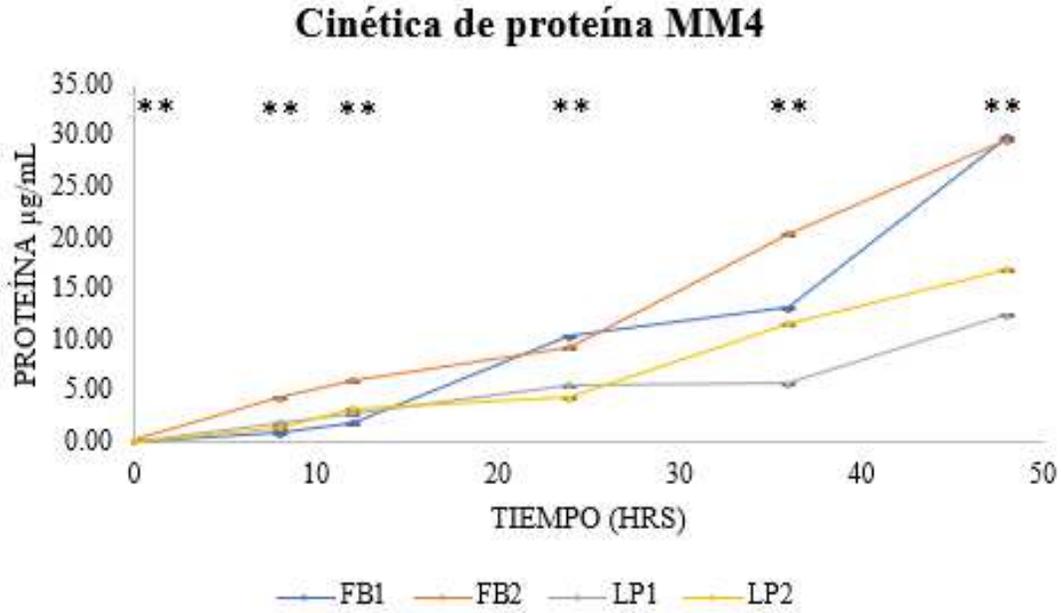
8.3.2 Cinéticas de crecimiento

- Para observar el crecimiento de la mutante, se realizó un análisis de la cinética de crecimiento en MM pH 4, 7 y 9. Se hicieron lecturas de la Absorbancia de los cultivos (ver datos suplementarios) y de la determinación de proteína celular a las 0, 8, 12, 24, 36 y 48hrs (ver datos suplementarios), y mediante la prueba de Tukey se analizaron las diferencias entre las cepas silvestres y mutantes (FB1 vs. LP1 y FB2 vs. LP2). También se le midió el pH inicial y final al medio y por último, se observaron las células al microscopio de fluorescencia tiñéndolas con blanco de calcofluor y DAPI a los tiempos 0, 24 y 48.
- A pH 4 el crecimiento de las cepas medida por la Absorbancia de los cultivos es muy similar (Figura 18), pero para comprobar el crecimiento celular se midió la cantidad de proteína, y en la Figura 19 se observa que las cepas FB1 y FB2 tienen un mayor crecimiento que las mutantes lo que hace más notorio de las 36hrs en adelante. El pH varió de 4 a 8 en las cepas silvestres y en las cepas mutantes hasta 7.5 (Tabla 10). En cuanto al aspecto microscópico de las células, se observó que se mantienen en forma de levadura hasta las 48hrs, y también se mantienen los núcleos bien formados dentro de las células a los tiempos 24 y 48 (Figuras 21 y 22) en que al tiempo 0 (Figura 20) parecen estar en etapas del ciclo celular distintas, aunque se ve una masa de ADN constante en todas las cepas.



** Diferencia altamente significativa entre los valores de la cepa silvestre contra la mutante correspondiente.

Figura 18. Cinética de crecimiento en MM pH4. Medidas de absorbancia en los tiempos tomados de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 en MM pH4. Las barras de error representan la desviación estándar



** Diferencia altamente significativa entre los valores de la cepa silvestre contra la mutante correspondiente

Figura 19. Cinética de proteína en MM pH4. Cinética de crecimiento donde se midió la proteína proveniente de las cepas y se graficó para comprobar el crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar

Tabla 10. Cambio de pH de cinética en MM pH4.

	pH inicial	pH final
FB1	4	8
LP1	4	7.5
FB2	4	8
LP2	4	7.5

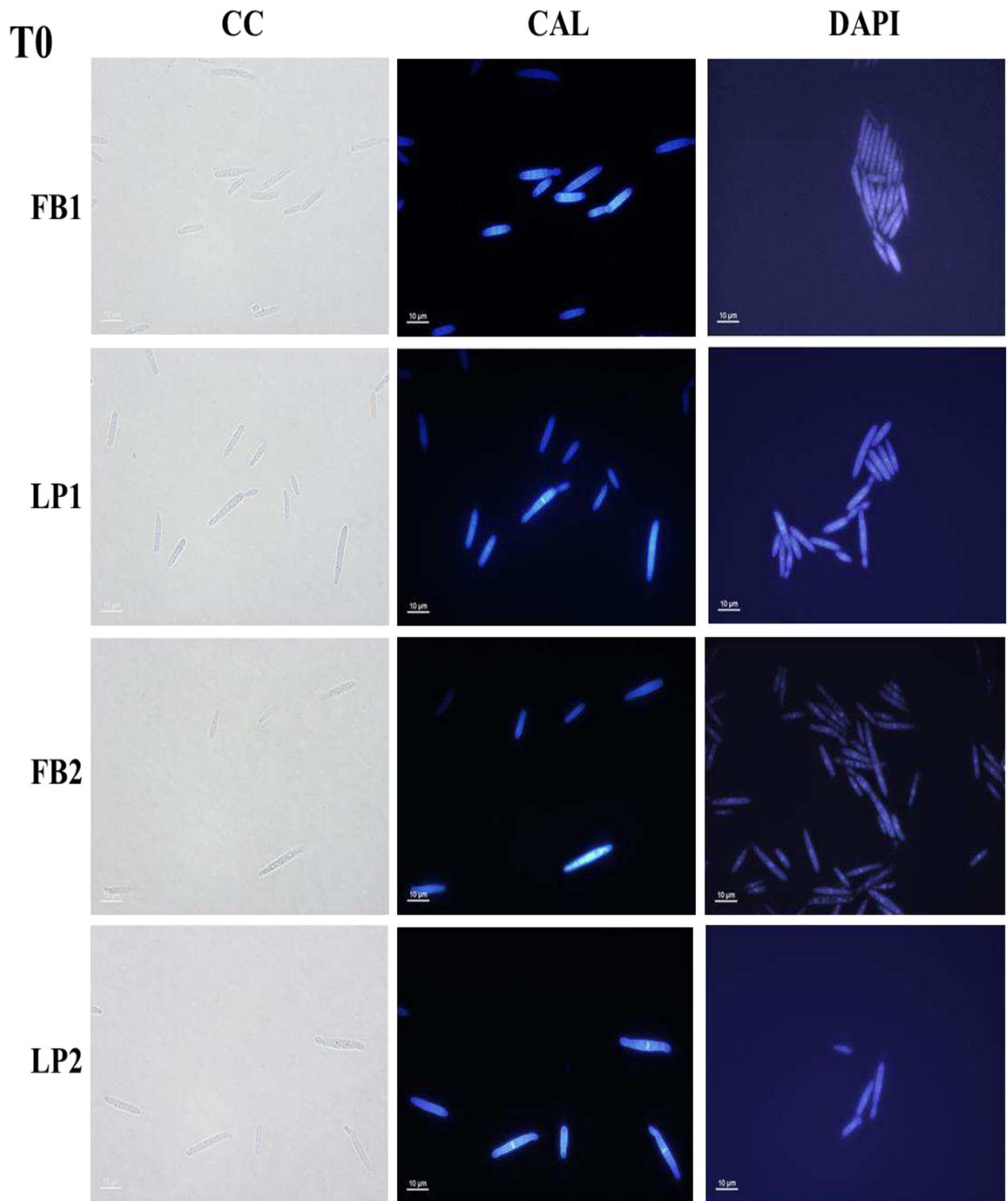


Figura 20. T0 de la cinética de crecimiento en MM pH4. Microscopía de las cepas de *U. maydis* en el tiempo 0 de la cinética de crecimiento en MM pH4 observadas en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y con DAPI (DAPI). Barra de escala 10µm.

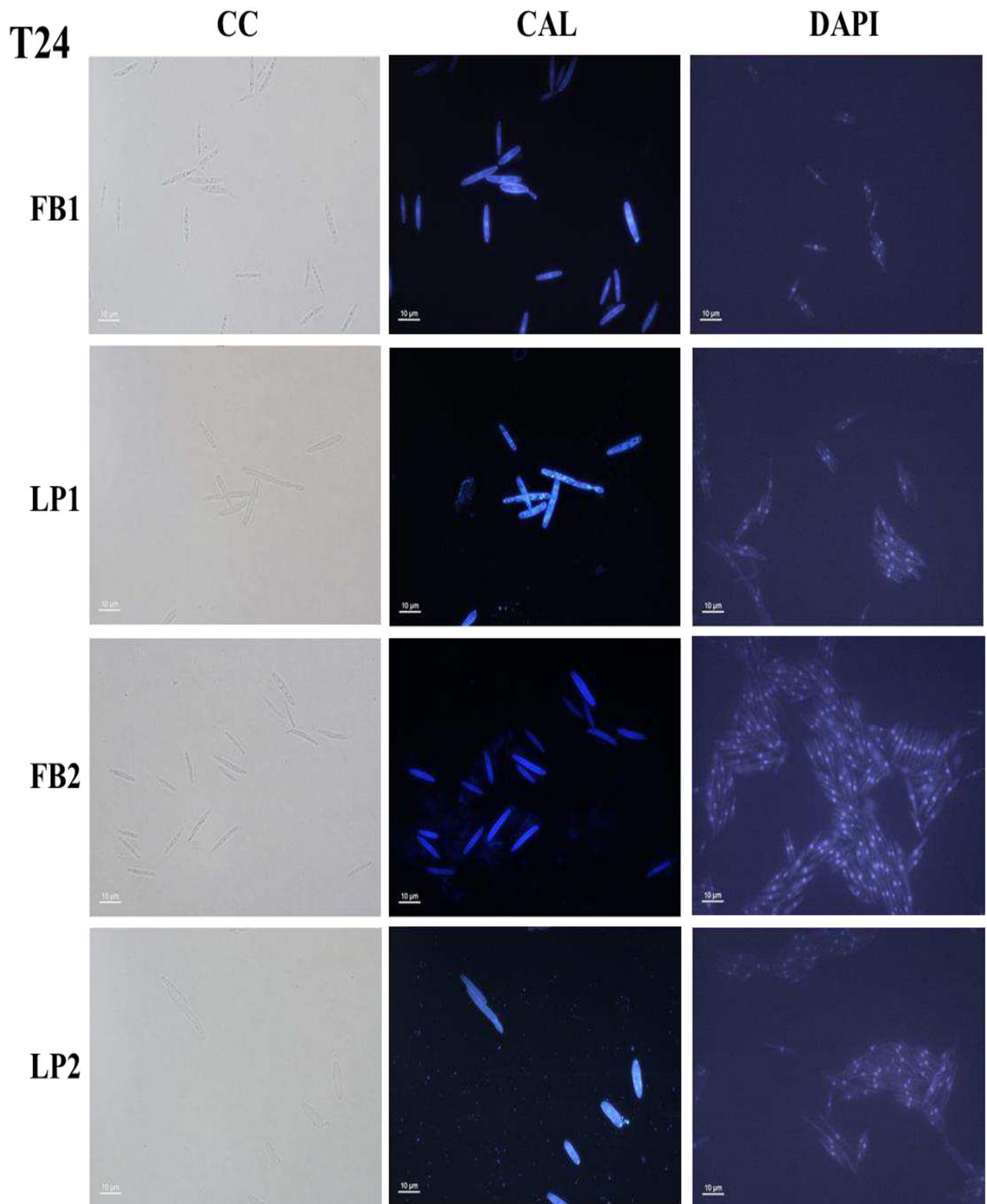


Figura 21. T24 de la cinética de crecimiento en MM pH4. Tiempo 24 de la cinética de crecimiento en MM pH4 donde las cepas silvestres FB1 y FB2, y las cepas mutantes LP1 y LP2 se observaron en campo claro (CC) y se tiñeron con calcofluor (CAL) y DAPI (DAPI). Barra de escala 10 μ m.

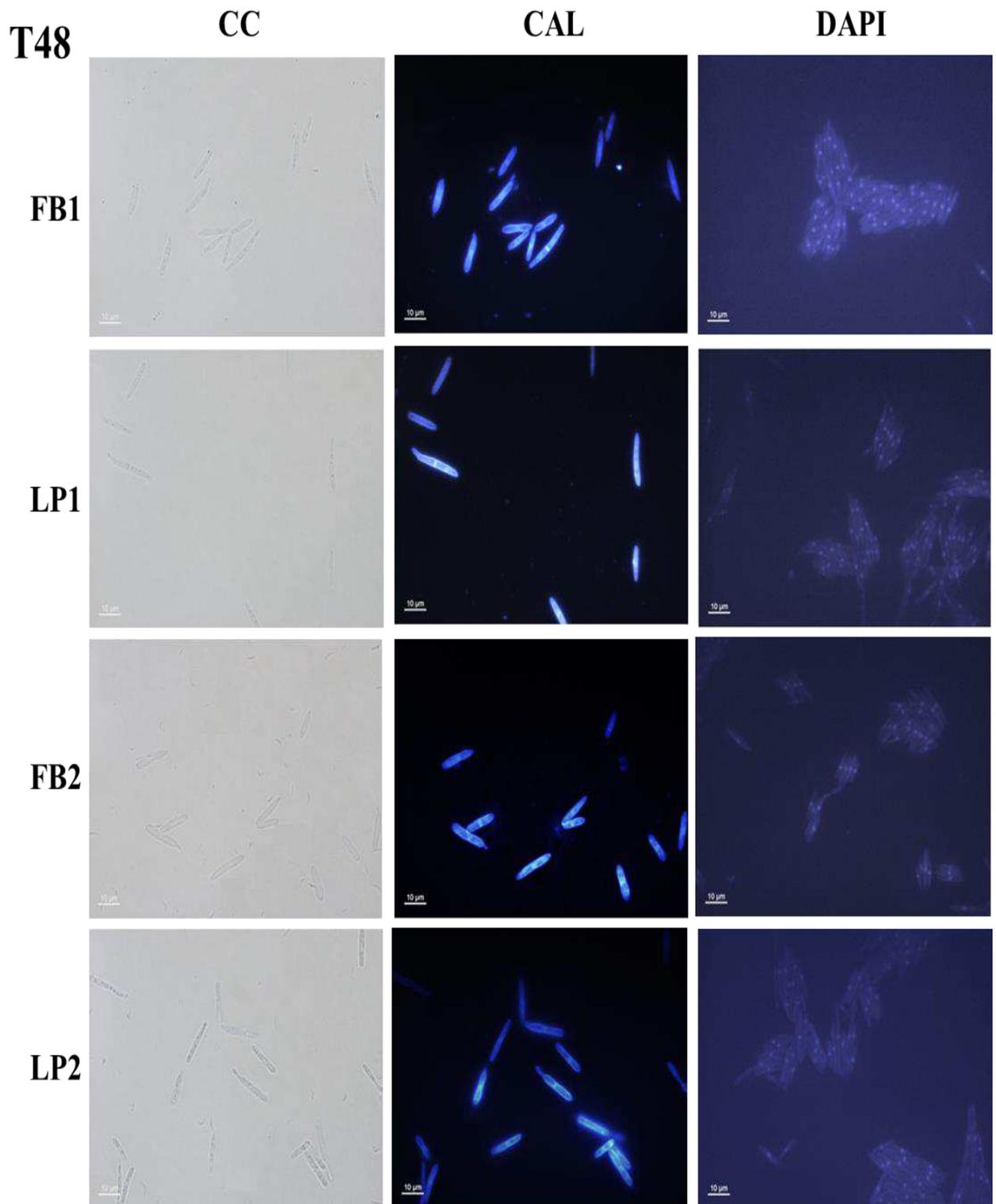
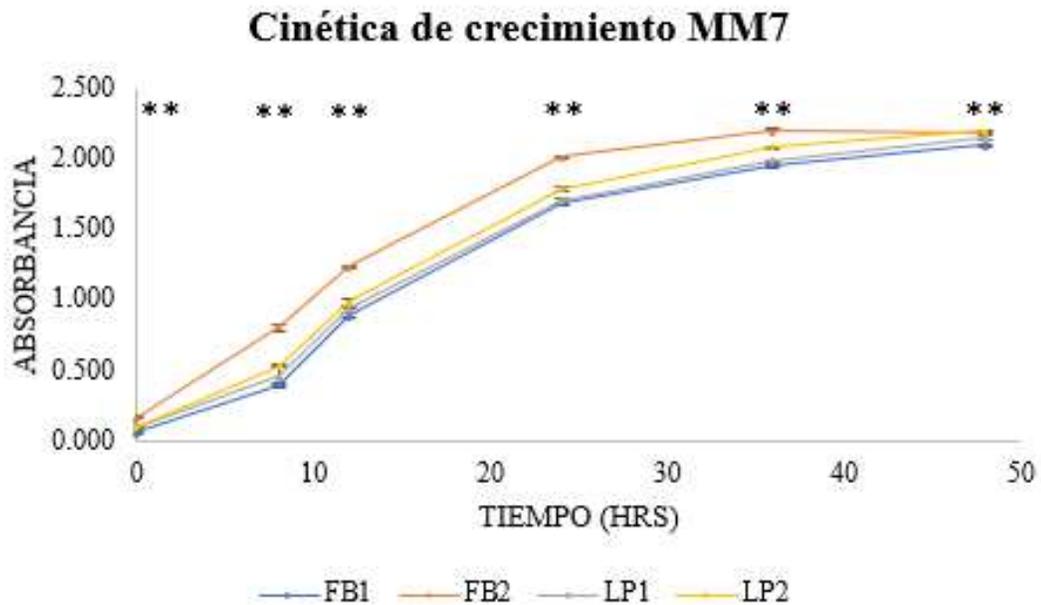


Figura 22. T48 de la cinética de crecimiento en MM pH4. Cepas silvestres y mutantes en el tiempo 48 de la cinética de crecimiento en MM pH4 observadas en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y con DAPI (DAPI). Barra de escala 10μm

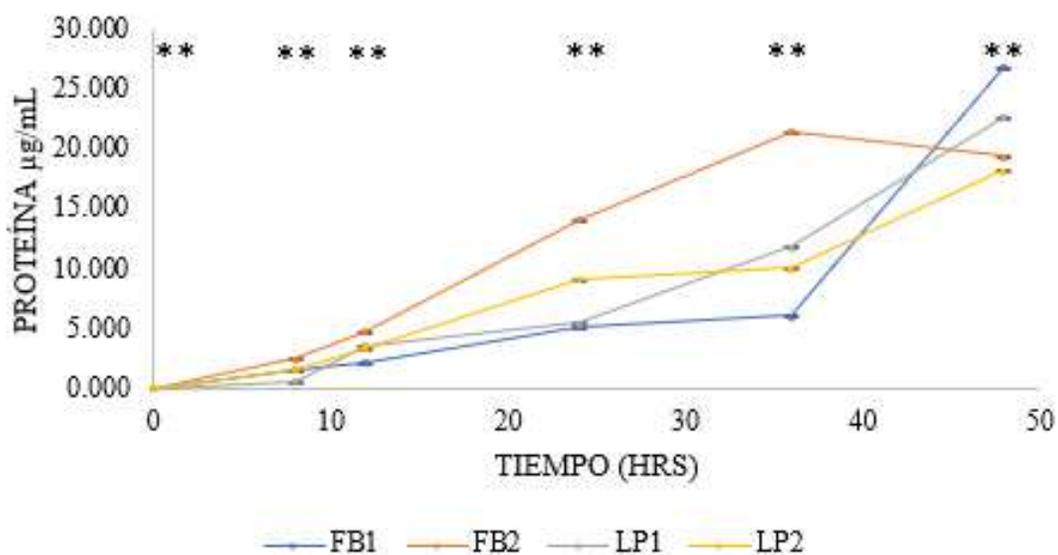
- El crecimiento a pH 7 medido por la absorbancia de los cultivos (Figura 23) de las cuatro cepas fue más semejante que con pH4. Sin embargo, al analizar la cantidad de proteína celular (figura 24), FB1 y FB2 se distancian mucho hasta el tiempo 48 donde casi se unen los puntos, y LP1 y LP2 se mantienen más cercanas y constantes. El pH en el medio tiende a alcalinizarse de nuevo llegando a un pH de 8 en todos los casos (Tabla 11). Microscópicamente todas las cepas permanecen en forma de levadura y los núcleos se mantienen bien en los tiempos de 0 y 24hrs (Figura 25 y 26), curiosamente para el tiempo 48, en LP1 y LP2 existen células donde no se aprecia un núcleo definido, o más bien, contienen una masa de ADN nuclear muy pequeña a diferencia de FB1 y FB2 (Figura 27).



** Diferencia altamente significativa entre los valores de la cepa silvestre contra la mutante correspondiente

Figura 23. Cinética de crecimiento en MM pH7. Absorbancias contra tiempo de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 en MM pH7. Las barras de error representan la desviación estándar

Cinética de proteína MM7



** Diferencia altamente significativa entre los valores de la cepa silvestre contra la mutante correspondiente

Figura 24. Cinética de proteína en MM pH7. Medición de proteína de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 a los diferentes tiempos en MM pH7. Las barras de error representan la desviación estándar

Tabla 11. Cambio de pH de cinética en MM pH7.

	pH inicial	pH final
FB1	7	8
LP1	7	8
FB2	7	8
LP2	7	8

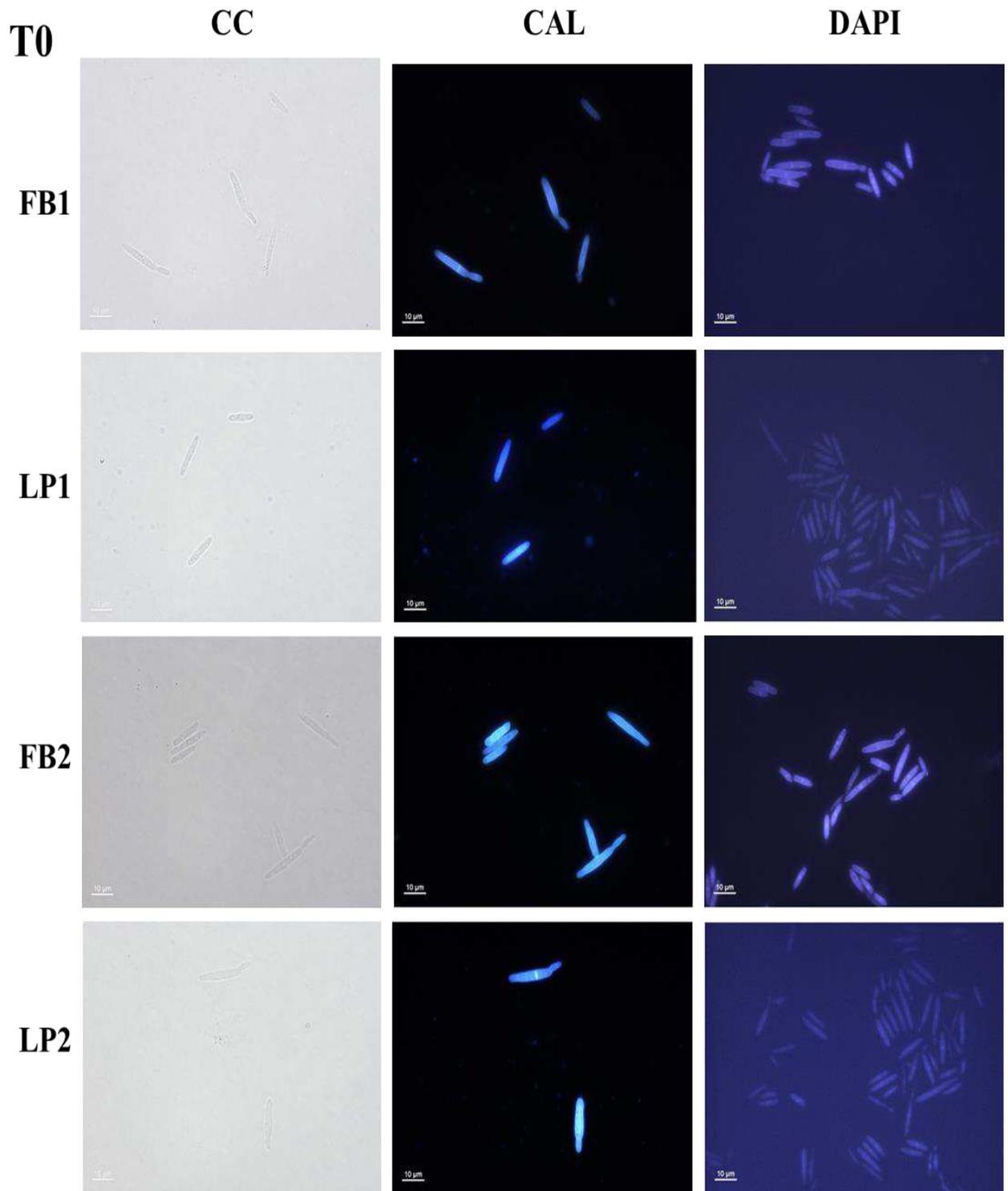


Figura 25. T0 de la cinética de crecimiento en MM pH7. Microscopía de la cinética de crecimiento en MM pH7 observando las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y con DAPI (DAPI). Barra de escala 10µm.

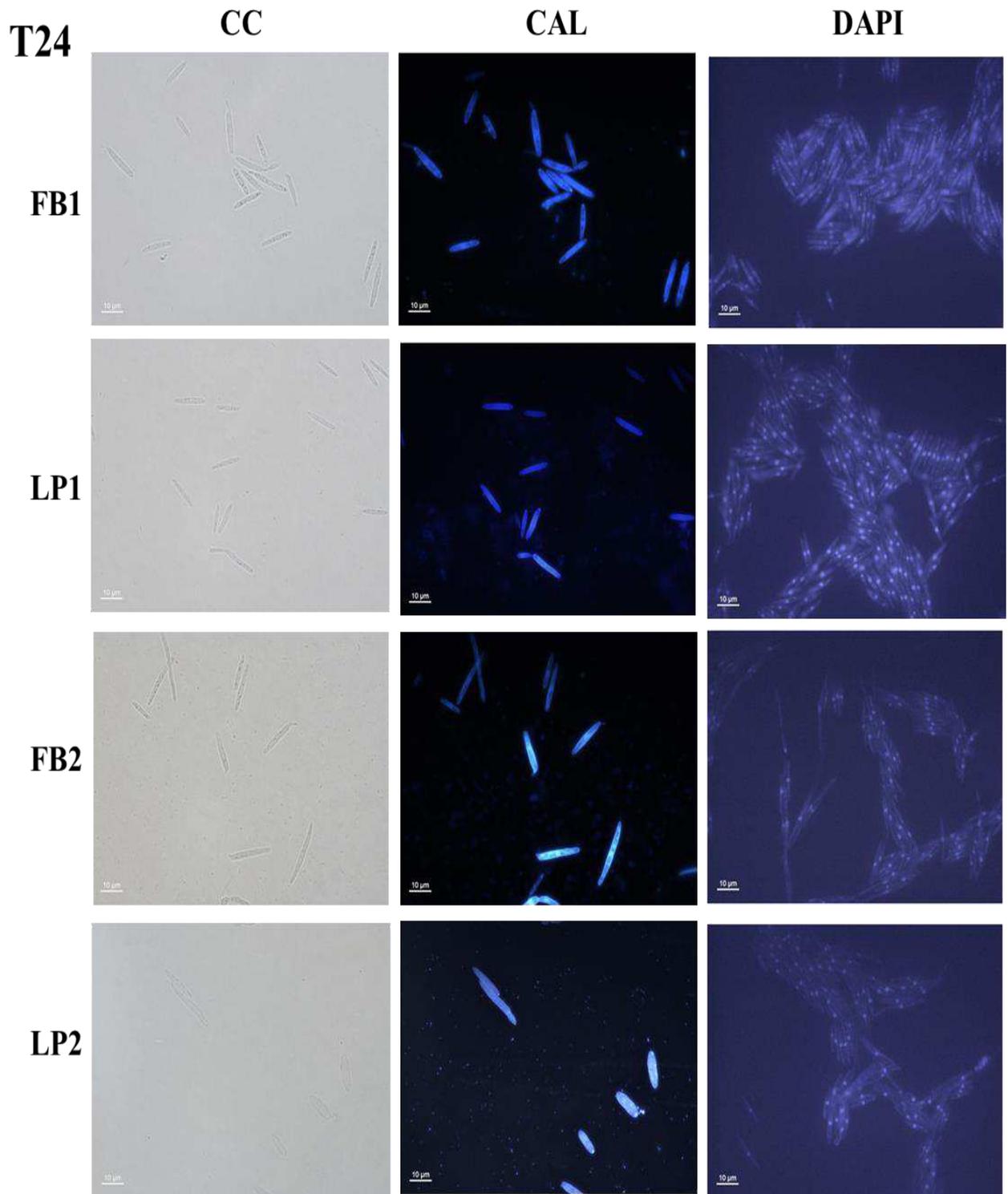


Figura 26. T24 de la cinética de crecimiento en MM pH7. Microscopía en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y DAPI (DAPI) de las cepas de *U. maydis* en el tiempo 24 de la cinética de crecimiento en MM pH7. Barra de escala 10µm.

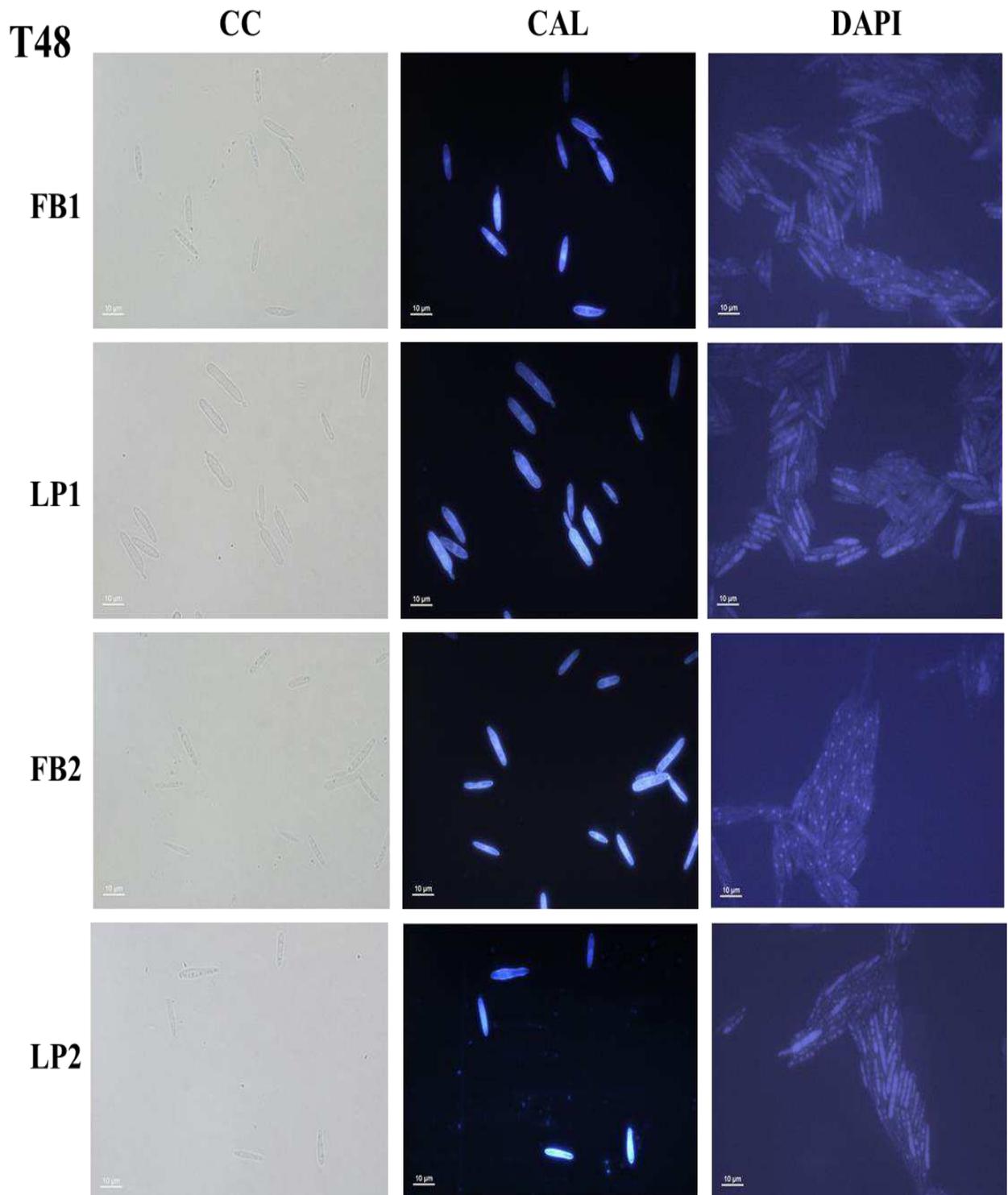
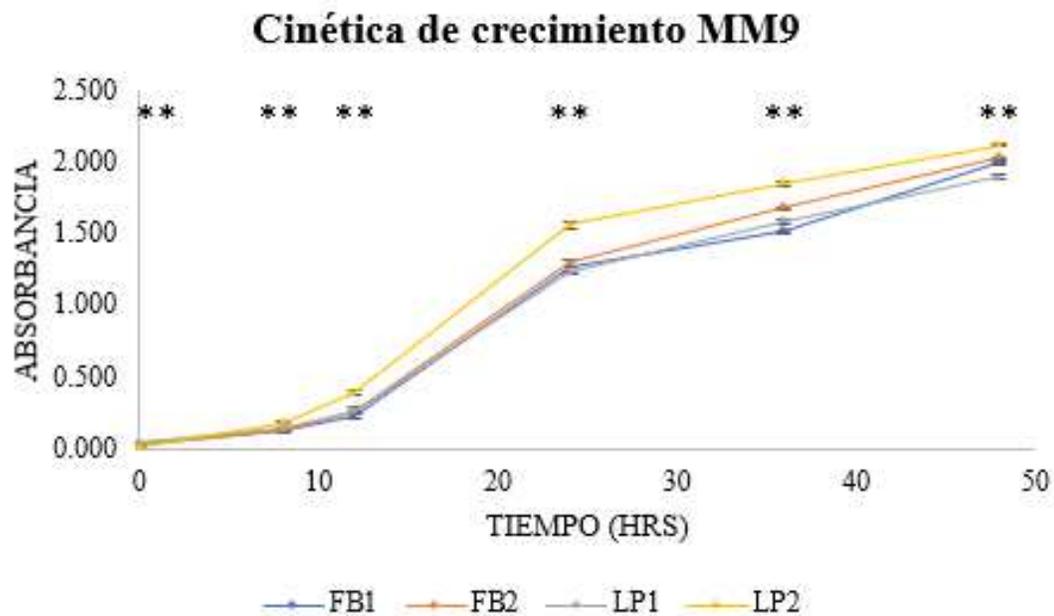


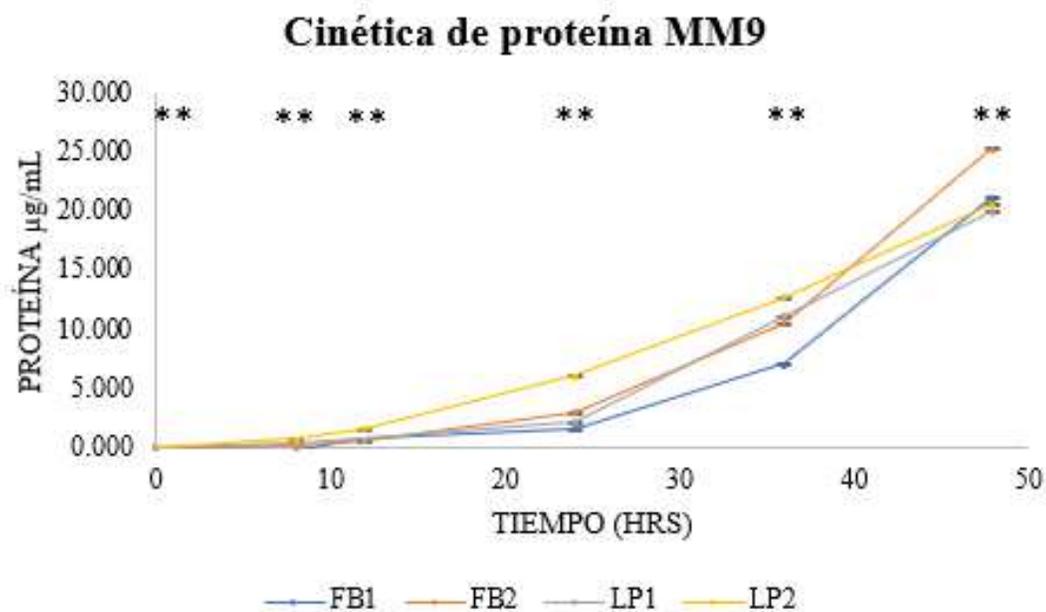
Figura 27. T48 de la cinética de crecimiento en MM pH7. Tiempo 48 de la cinética de crecimiento en MM pH7, observando a las cepas silvestres y mutantes en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y con DAPI (DAPI). Barra de escala 10μm.

- A pH 9 durante la cinética, las absorbancias fueron muy parecidas entre las cepas (Figura 28) y esto se observa también en la cinética de proteína (Figura 29). Una diferencia visible en la cinética de proteína en pH9 contra la de pH4 y pH7, es el tiempo que tarda en empezar la fase exponencial, cuando en los otros pH's comienza entre los tiempos 8 y 12, en pH9 se extiende hasta el tiempo 20 y 24 teniendo su mayor crecimiento después de estos. En las otras cinéticas, *U. maydis* tenía que alcalinizar el medio hasta llegar a un pH de 8, en este caso, tuvo que acidificarlo para llegar a este pH (Tabla 12) y puede que la causa del retraso en la fase exponencial sea la complicación para acidificar y adaptar el medio. Al observar las células al microscopio con calcofluor se ven en forma de levadura un poco más cortas y redondas (figuras 30 y 31), y para el tiempo 48, los núcleos de algunas células de LP1 y LP2 se ven dispersos, sin definir, incluso unas sin fluorescer (figura 32).



** Diferencia altamente significativa entre los valores de la cepa silvestre contra la mutante correspondiente

Figura 28. Cinética de crecimiento en MM pH9. Mediciones de absorbancia en un periodo de 48hrs de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2. Las barras de error representan la desviación estándar



** Diferencia altamente significativa entre los valores de la cepa silvestre contra la mutante correspondiente

Figura 29. Cinética de proteína en MM pH9. Crecimiento de las cepas de estudio midiendo la cantidad de proteína presente a tiempos determinados. Las barras de error representan la desviación estándar

Tabla 12. Cambio de pH de cinética en MM pH9. Cambio en el pH del medio MM pH9 de las cepas silvestres y mutantes.

	pH inicial	pH final
FB1	9	8
LP1	9	8
FB2	9	8
LP2	9	8

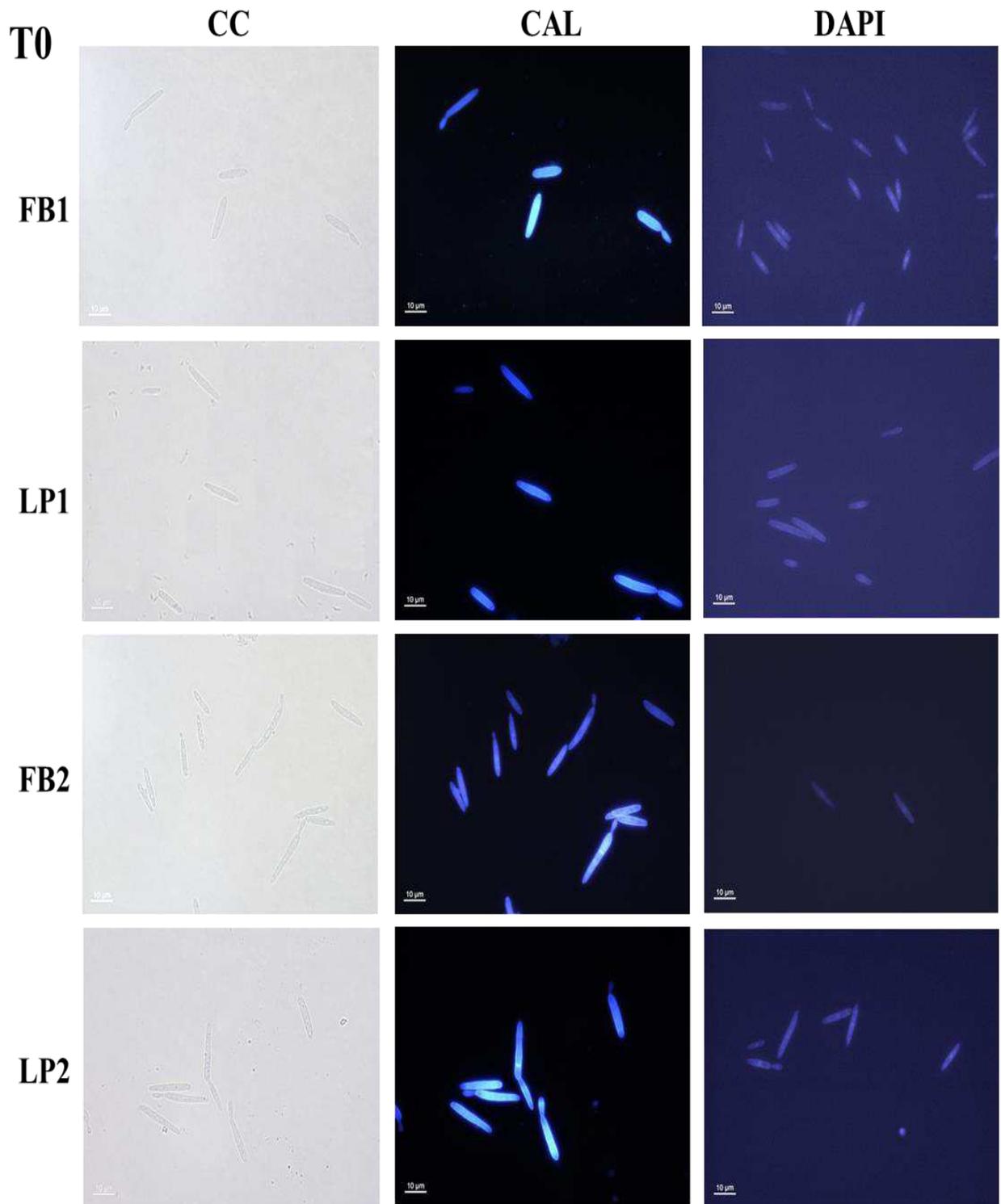


Figura 30. T0 de la cinética de crecimiento en MM pH9. Cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 en la cinética de crecimiento a pH9 vistas en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y DAPI (DAPI) al tiempo 0. Barra de escala 10µm.

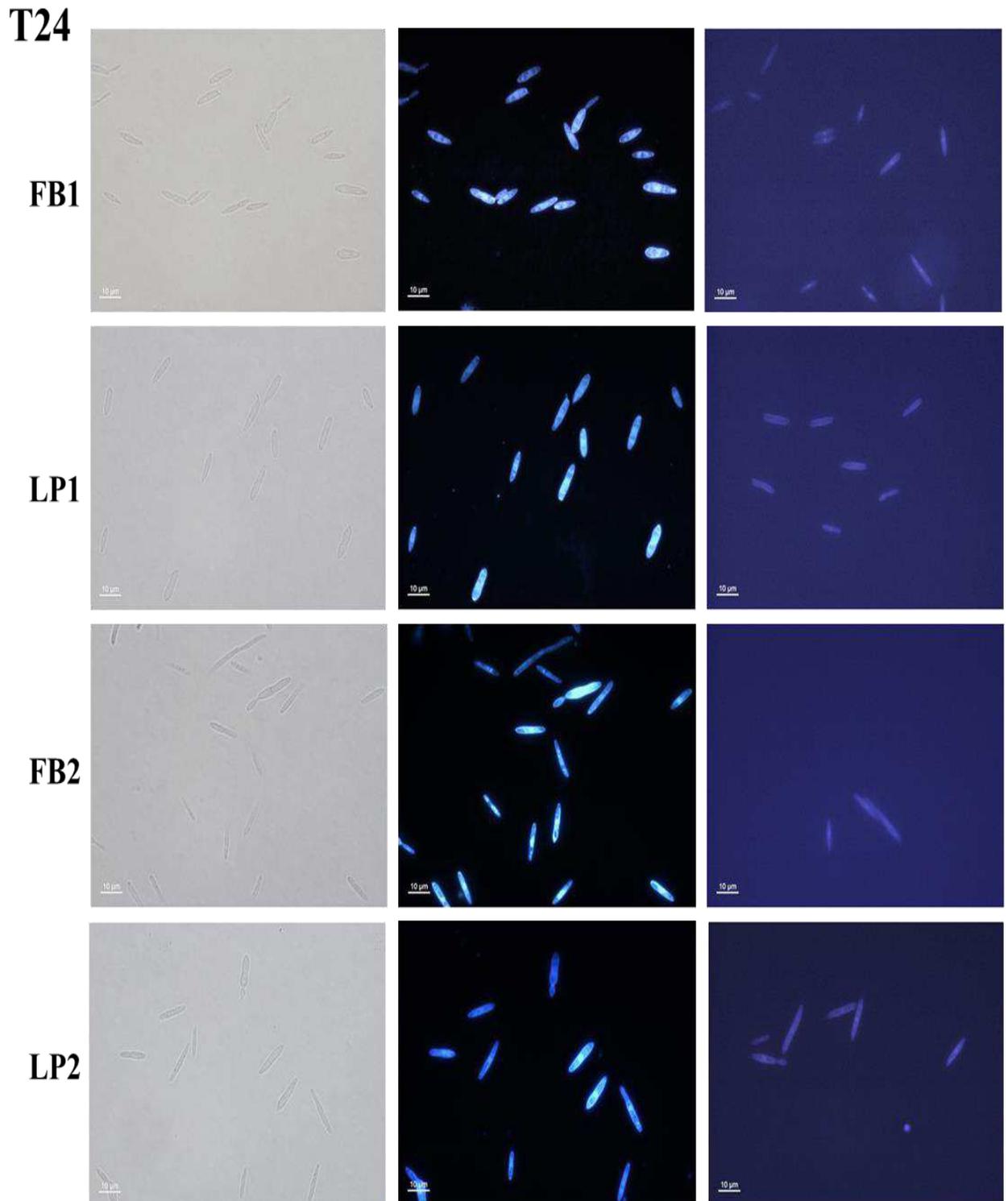


Figura 31. T24 de la cinética de crecimiento en MM pH9. Cepas de *U. maydis* al tiempo 24 de la cinética de crecimiento en MM pH9 observadas en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y DAPI (DAPI) al tiempo 0. Barra de escala 10µm.

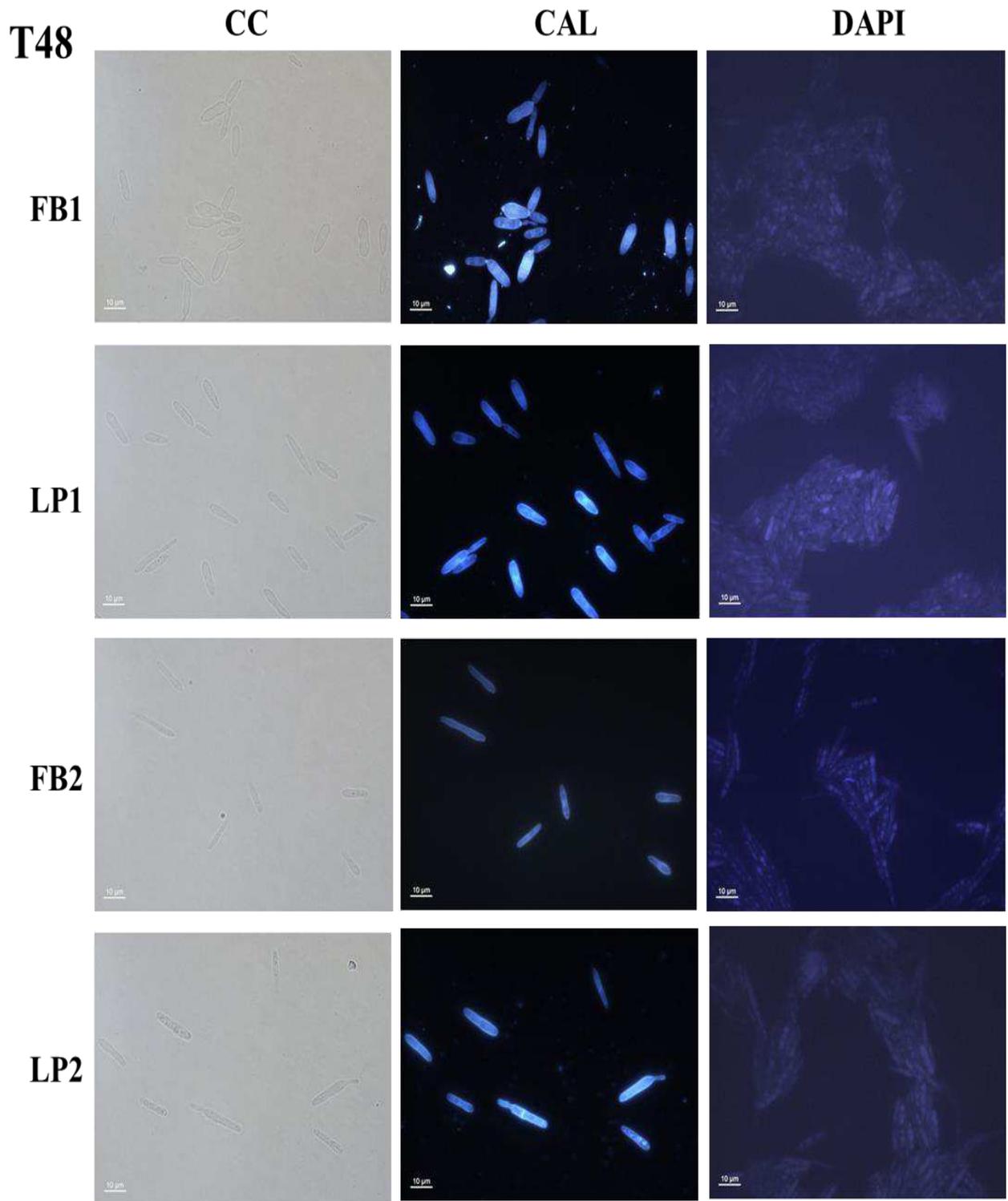
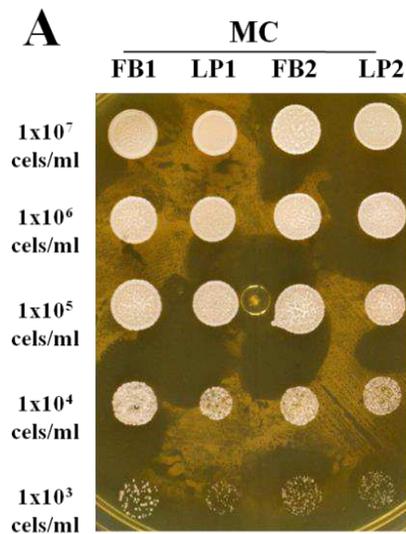


Figura 32. T48 de la cinética de crecimiento en MM pH9. Microscopía en campo claro (CC), con calcofluor (CAL) y DAPI (DAPI) al tiempo 48 de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 en la cinética de crecimiento en pH9. Barra de escala 10µm.

Respuesta a estrés

- Al exponer las cepas de *U. maydis* de estudio a diferentes condiciones de estrés en medios sólidos, no se observaron diferencias en el crecimiento de las mutantes contra las cepas silvestres, en contraste con lo observado microscópicamente en los tratamientos en medio líquido, las células mostraron notables alteraciones morfológicas. En el control donde se crecieron en MC (Figura 33), las cepas mantienen su forma típica y la tinción con blanco de calcofluor revela la presencia de un septo en su mayoría, a excepción de las mutantes, que poseen múltiples septos en diferentes zonas.



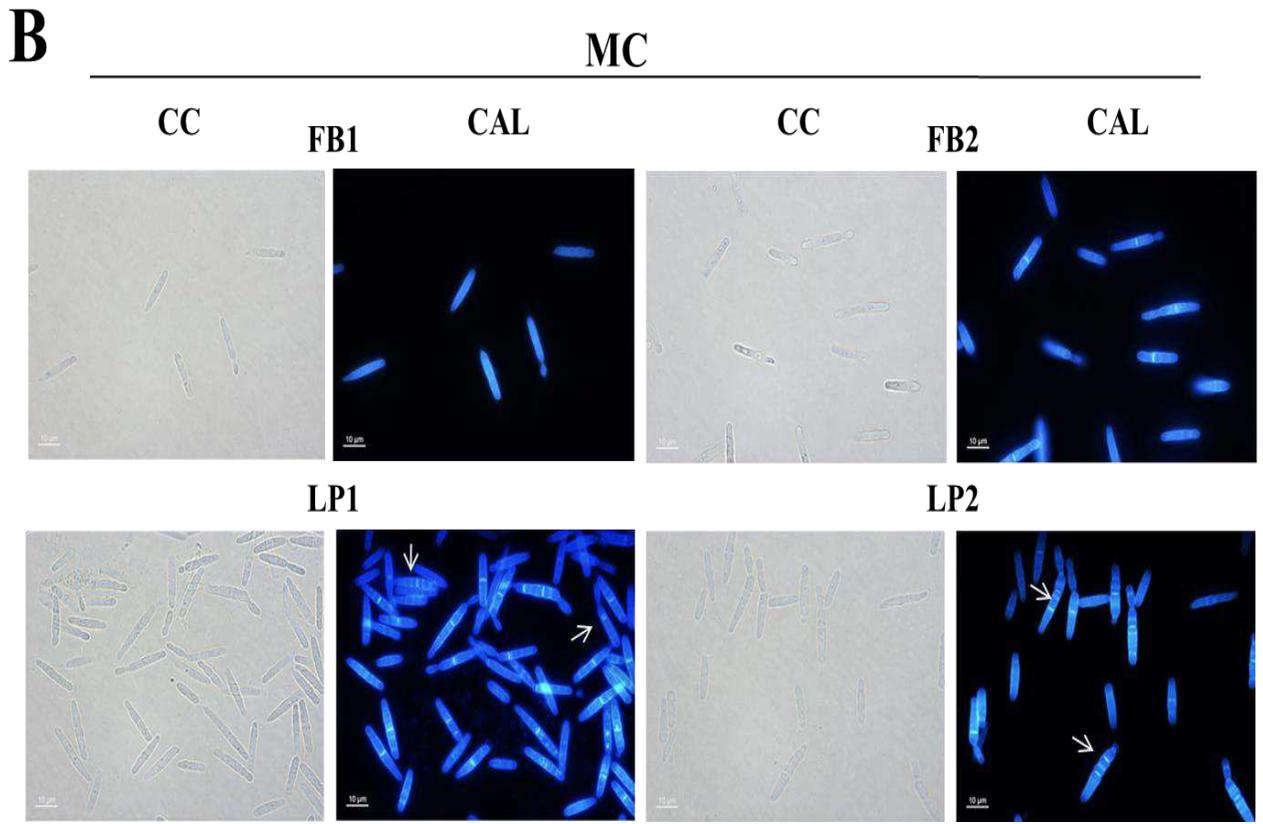
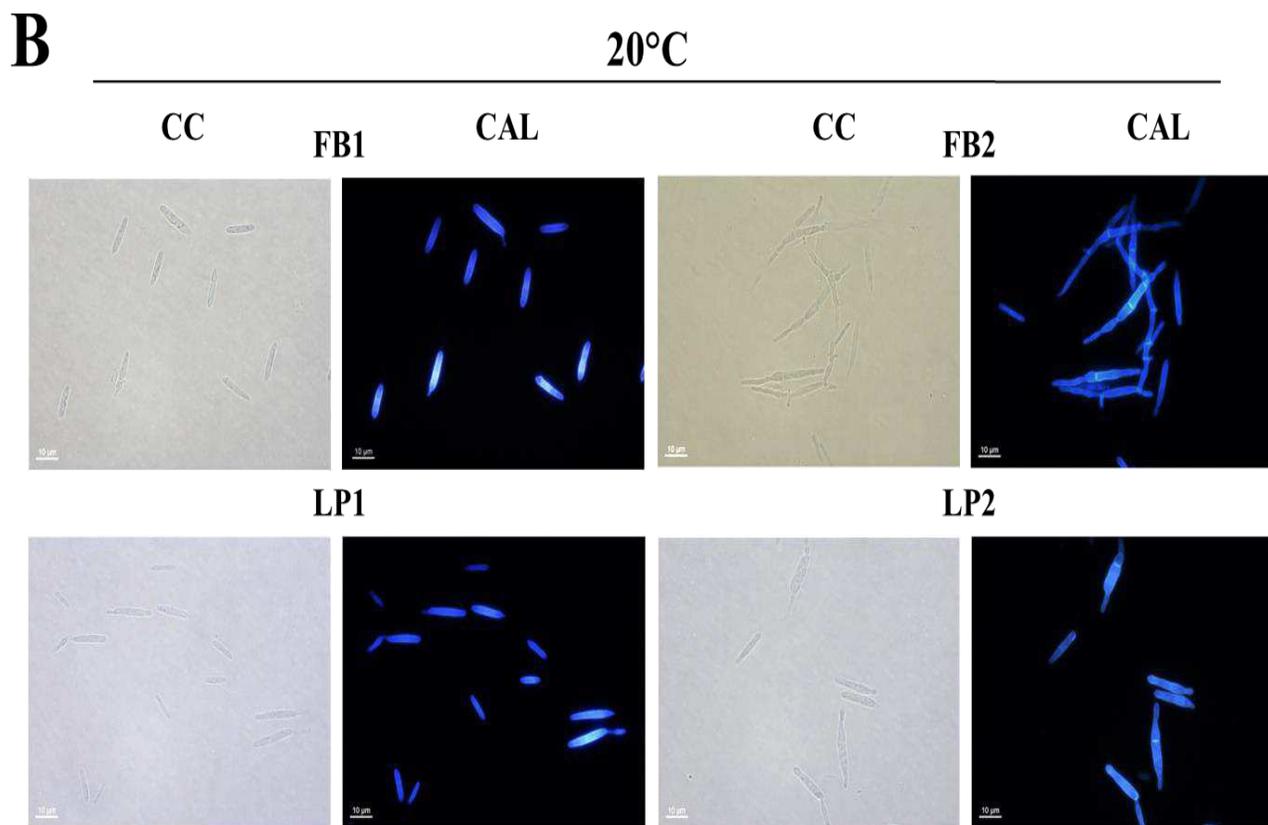
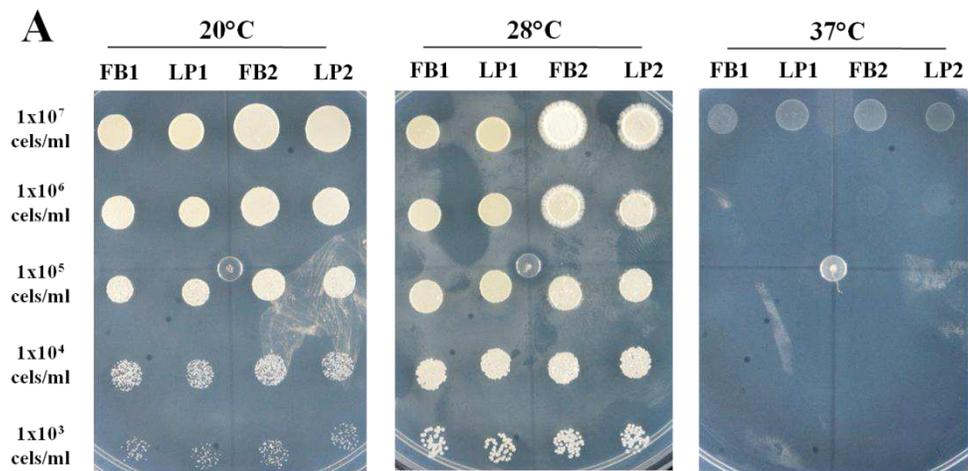


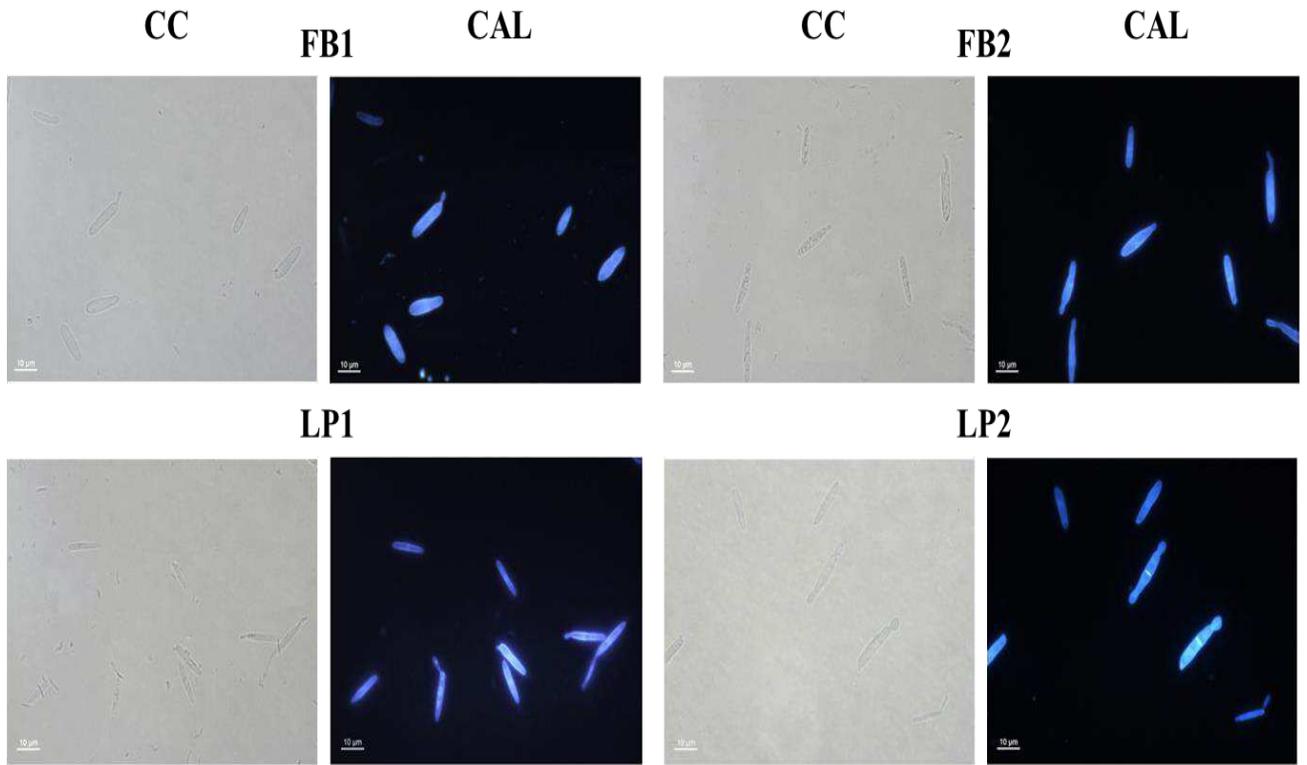
Figura 33. Control en MC. Crecimiento en MC en medio sólido (A) y líquido (B) de las cepas silvestres y mutantes observadas en campo claro (CC) y con calcofluor (CAL). Barra de escala 10 μ m.

8.3.3 Estrés por temperatura

- En el estrés por temperatura, las células a 30°C crecen en forma de levadura sin diferencias entre cepas al ser ésta su temperatura óptima. Al crecerlas a 20°C, la cepa silvestre FB2 se muestra delgada y alargada al reaccionar al estrés, mientras que la cepa LP2 sigue con la forma cilíndrica al igual que FB1 y LP1. A una temperatura mayor, como lo son 37°C, todas las cepas toman una morfología anormal, las células son más anchas, septadas y con abultamientos, y en medio sólido su crecimiento es muy pobre incluso al usar un inóculo de 10⁷cels/mL (Figura 34).



30°C



37°C

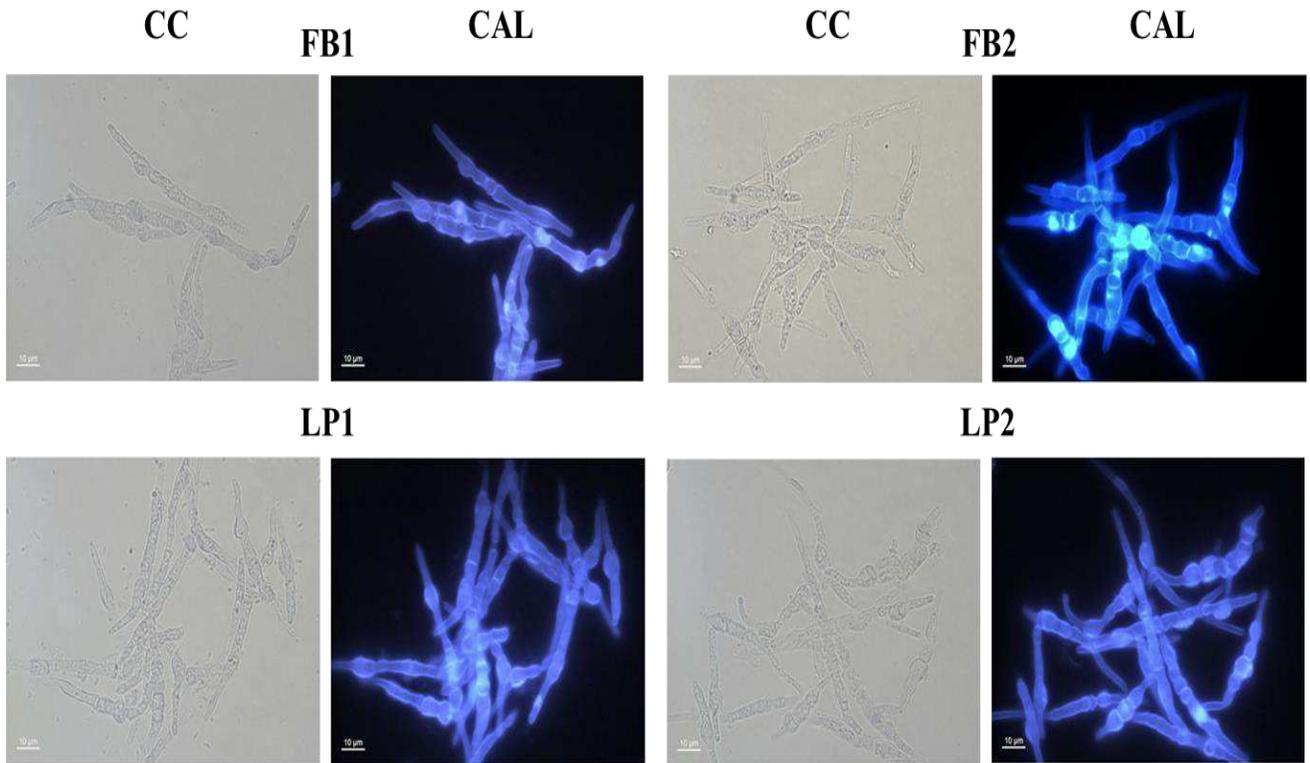
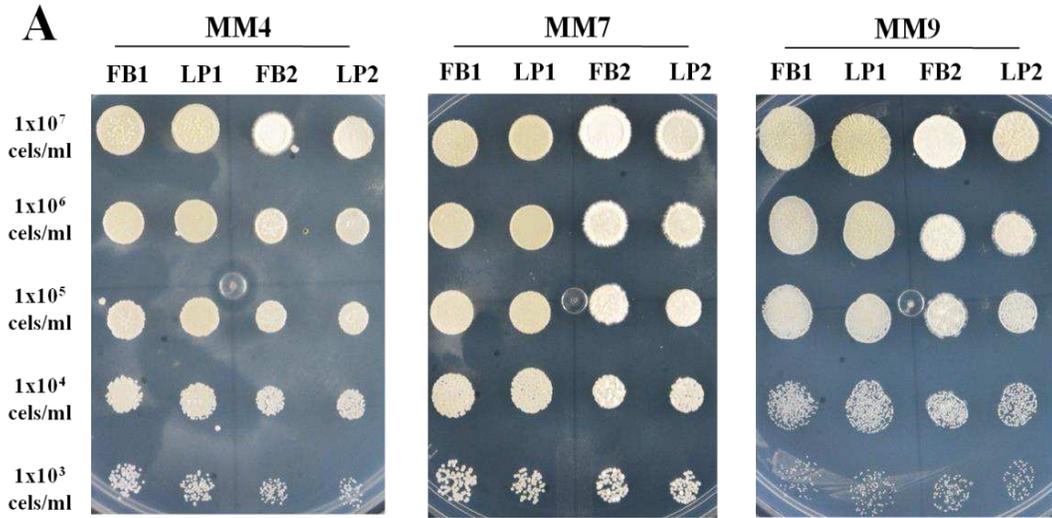


Figura 34. Estrés por temperatura. Estrés por temperatura en MM pH7 sólido (A) y líquido (B) expuestos a tres temperaturas que son 20°C, 28°C y 37°C observadas en campo claro (CC) y con calcofluor (CAL). Barra de escala 10μm

8.3.4 Estrés por pH

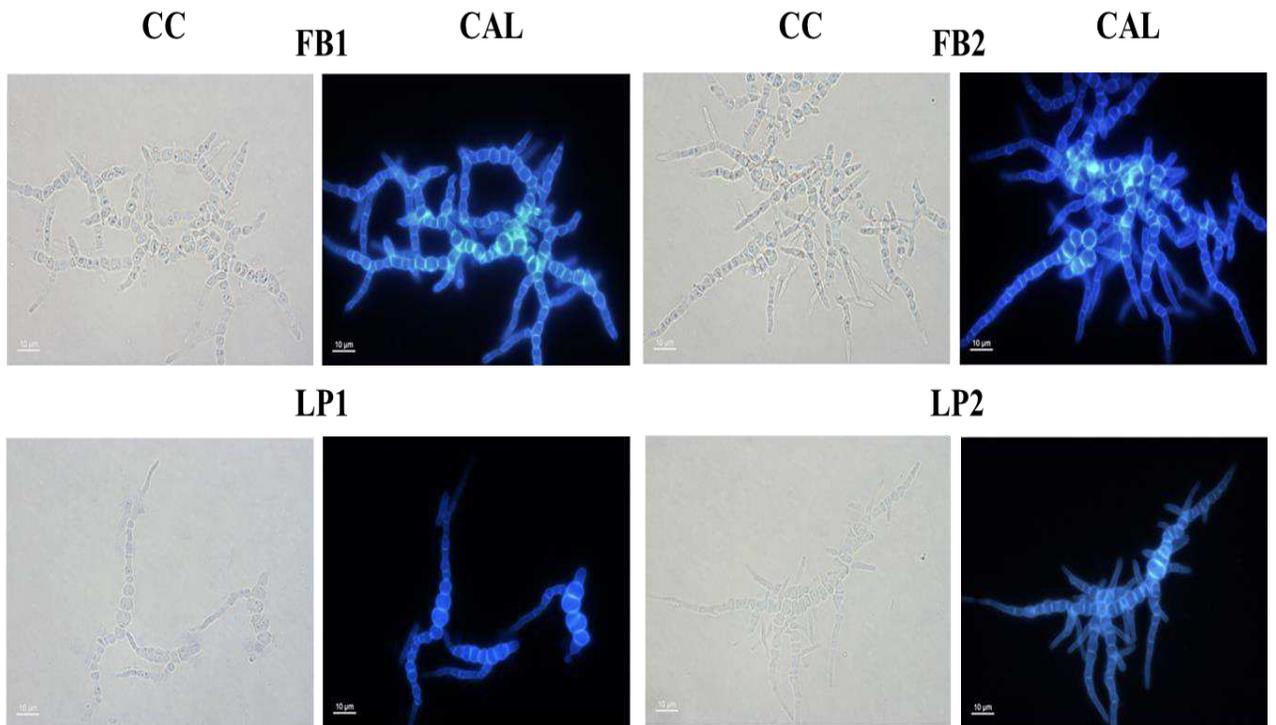
- Se utilizaron tres valores de pH's que se mantuvieron estables hasta las 48hrs del tratamiento (Figura 35). A pH neutro 7, tanto las cepas silvestres como las mutantes mantuvieron su forma levaduriforme, muy diferente a lo observado a pH 3, donde las cepas FB1 y FB2 forman un micelio largo y septado, y las cepas mutantes parecen tener dificultades para formar el micelio, siendo mucho más cortos y sin poder aglomerarse. A pH 9 la morfología de las células es muy diferente observándose las células de las cepas silvestres aparecen multigemantes o en forma de racimos y mantienen su forma levaduriforme, más cortas, redondas y unidas entre sí. En el caso de las cepas mutantes una proporción de células muestra un

alargamiento y con un mayor número de septos, lo que indica que en las cepas carentes de *SIZ1* a un pH ácido, como el 3, y un pH alcalino de 9, afectan la deposición de septos.

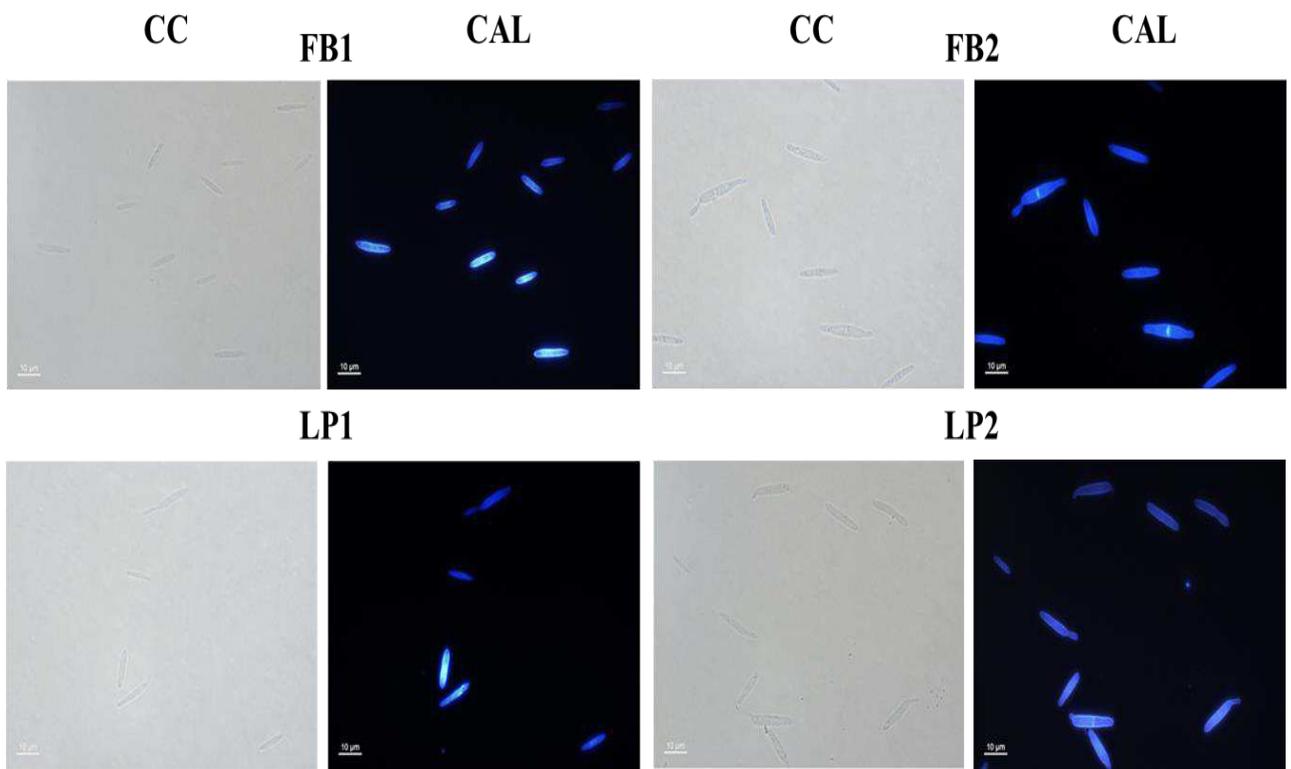


B

MM3



MM7



MM9

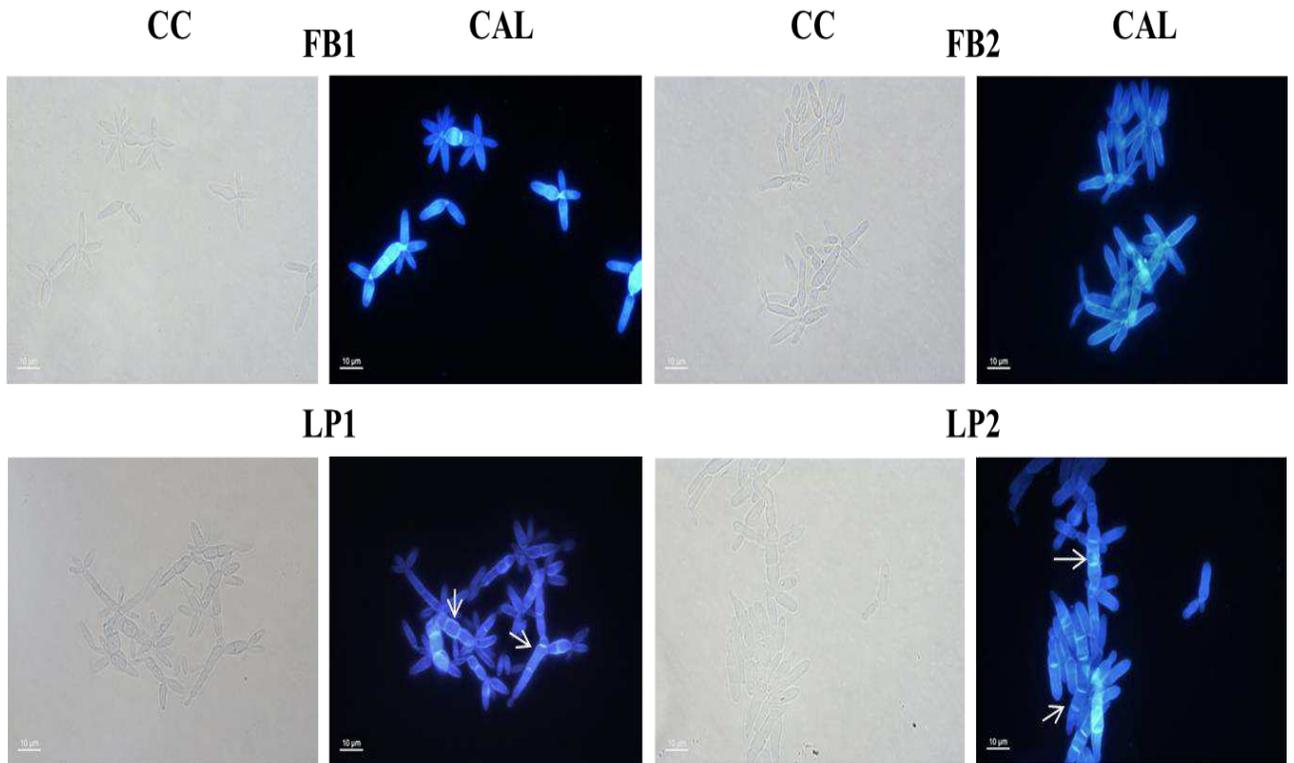
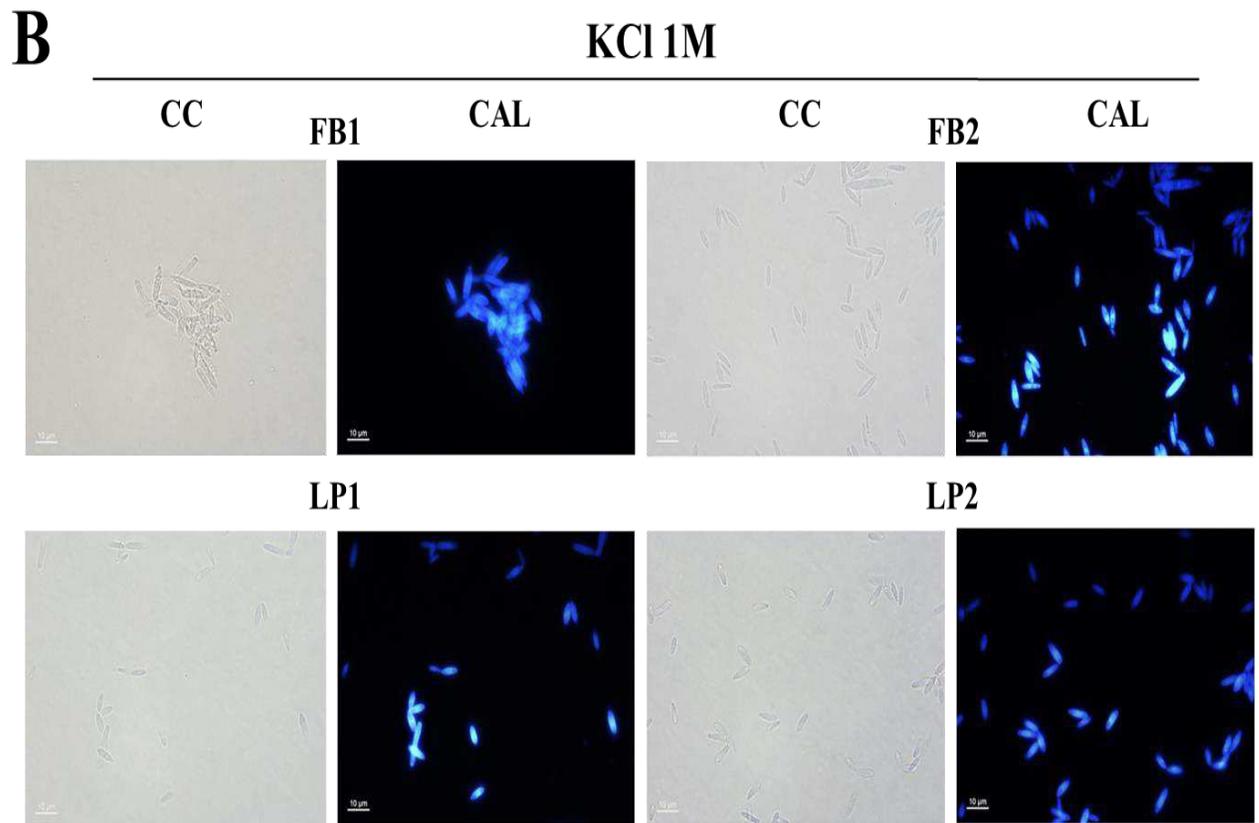
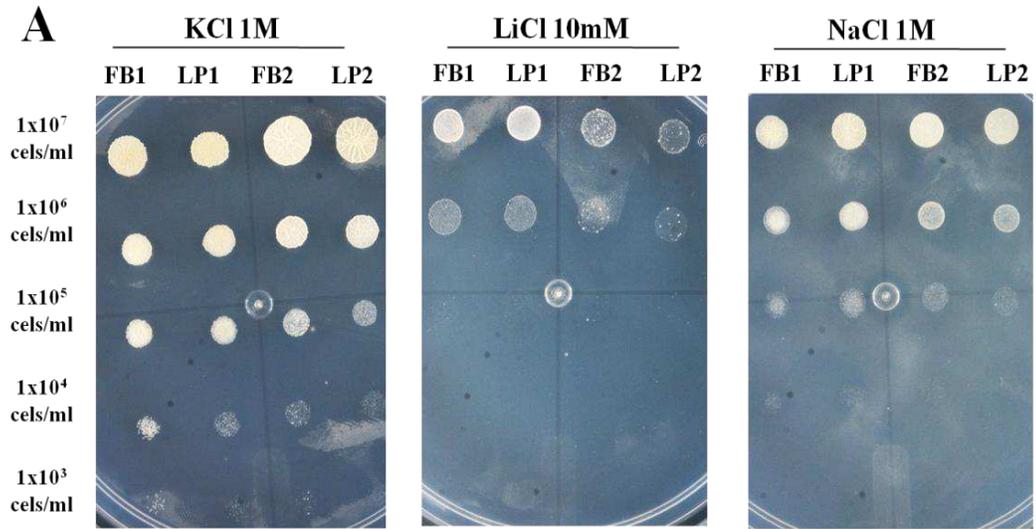


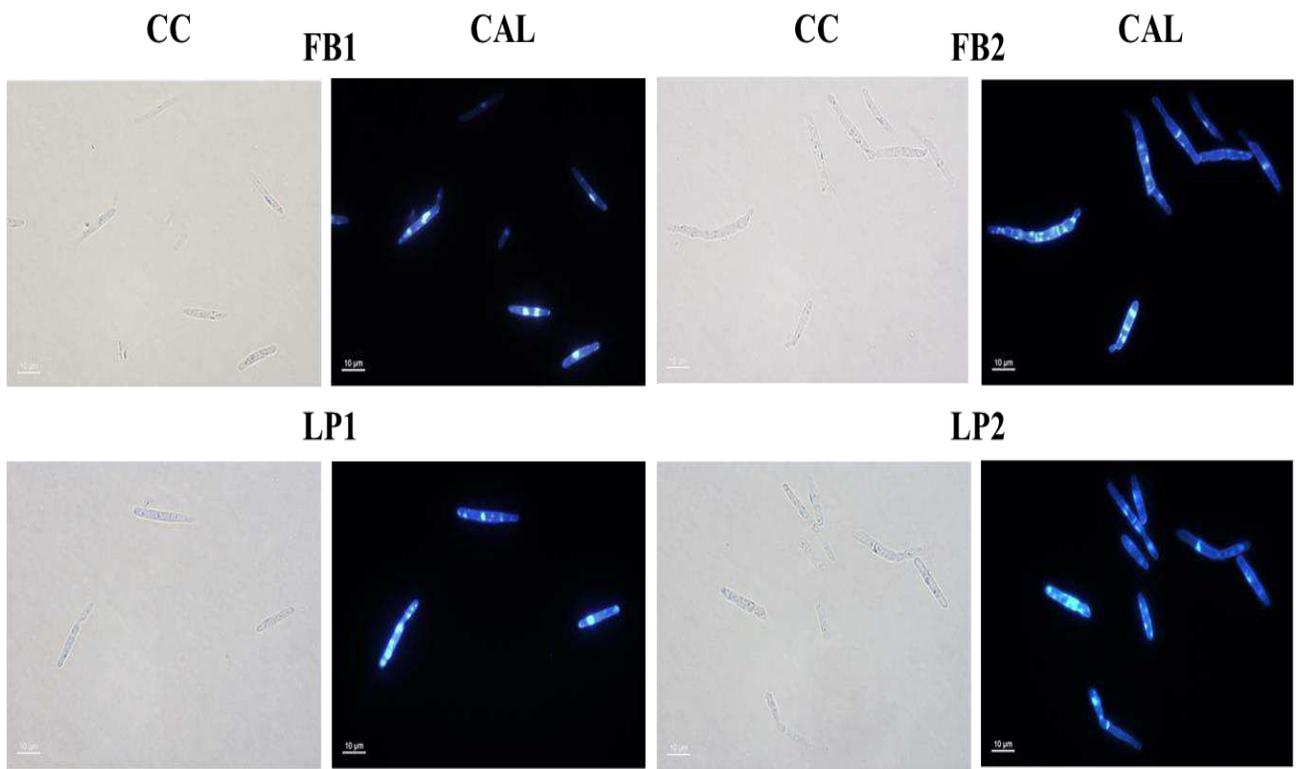
Figura 35. Estrés por pH. Crecimiento macroscópico a pH 4, 7 y 9 en MM sólido (A) y crecimiento microscópico a pH 3, 7 y 9 en MM líquido (B) de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 en campo claro (CC) y calcofluor (CAL). Barra de escala 10µm.

8.3.5 Estrés por choque iónico y osmótico

- Al observar al microscopio de fluorescencia el efecto de diferentes componentes sobre las cepas de estudio, se vió que por la adición de KCl 1M, las células se tornan más pequeñas de lo normal, aunque no existe una diferencia evidente entre las cepas silvestres y mutantes. Bajo la influencia del LiCl 10mM, se observan algunos puntos donde se concentra la fluorescencia del blanco de calcofluor en todas las células, que puede tratarse de vacuolas al ser el LiCl tóxico y, además de esto, no se percibe alguna diferencia entre las cepas. Algo diferente sucede al estar en contacto con NaCl 1M, ya que la cepa FB2 se ve algo más alargada que las demás cepas (Figura 36).



LiCl 10mM



NaCl 1M

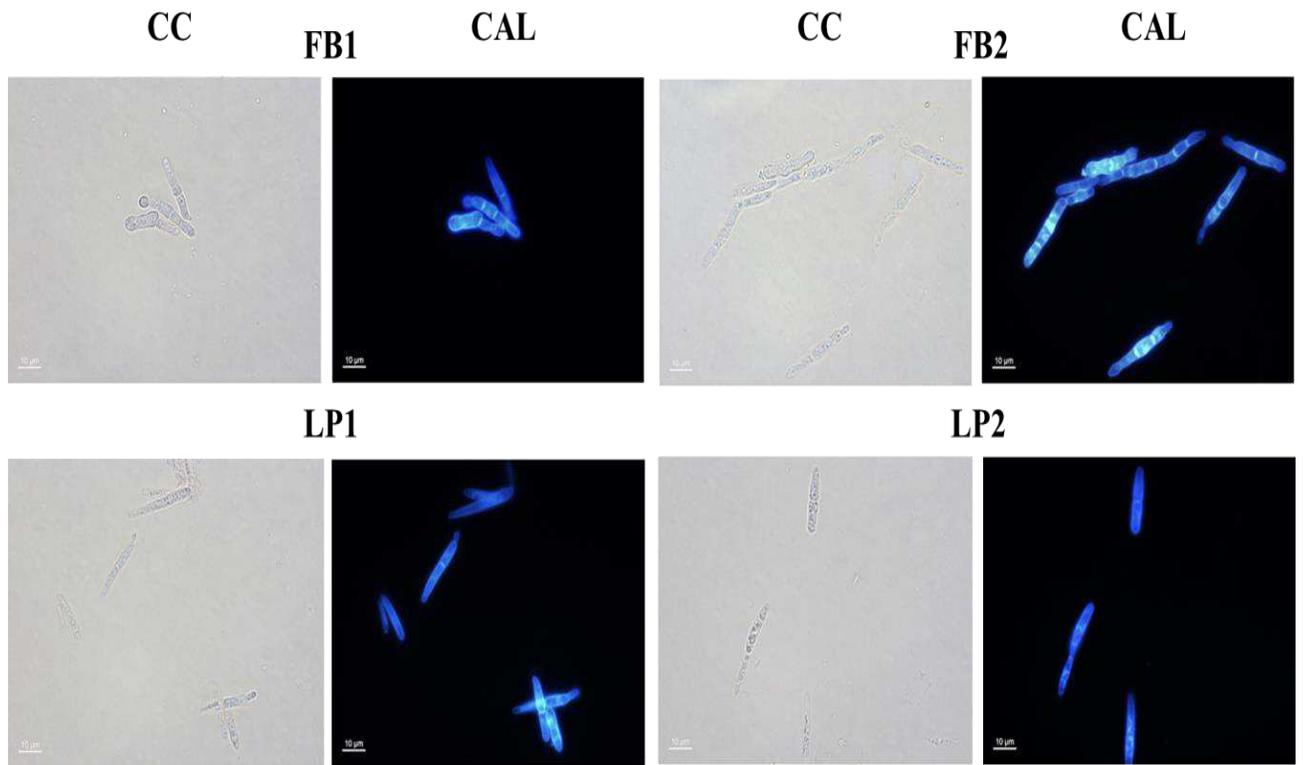
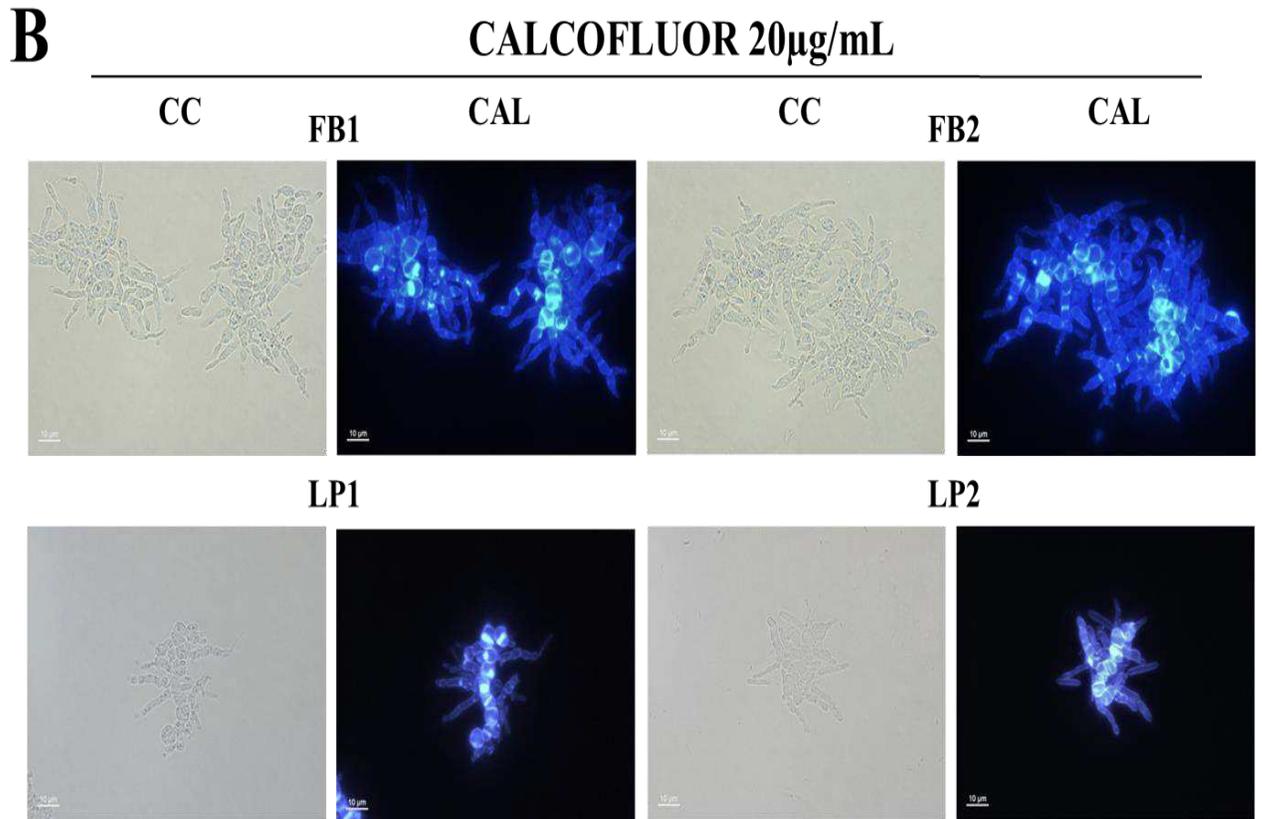
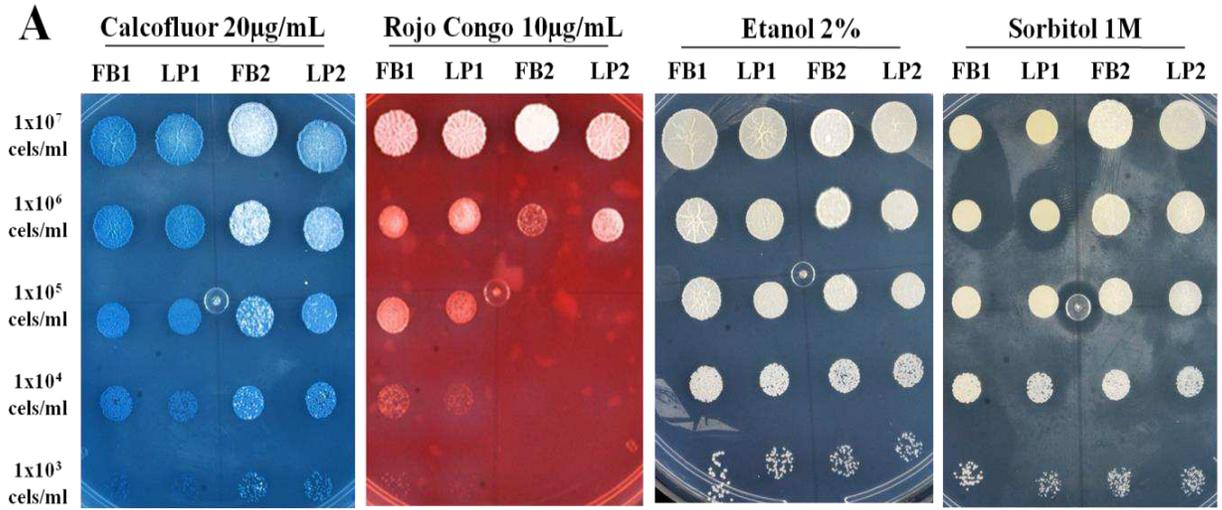


Figura 36. Estrés por choque iónico y osmótico. Tratamiento de estrés iónico con KCl y LiCl, y osmótico con NaCl en MM pH7 sólido (A) y líquido (B) observadas en campo claro (CC) y calcofluor (CAL). Barra de escala 10µm.

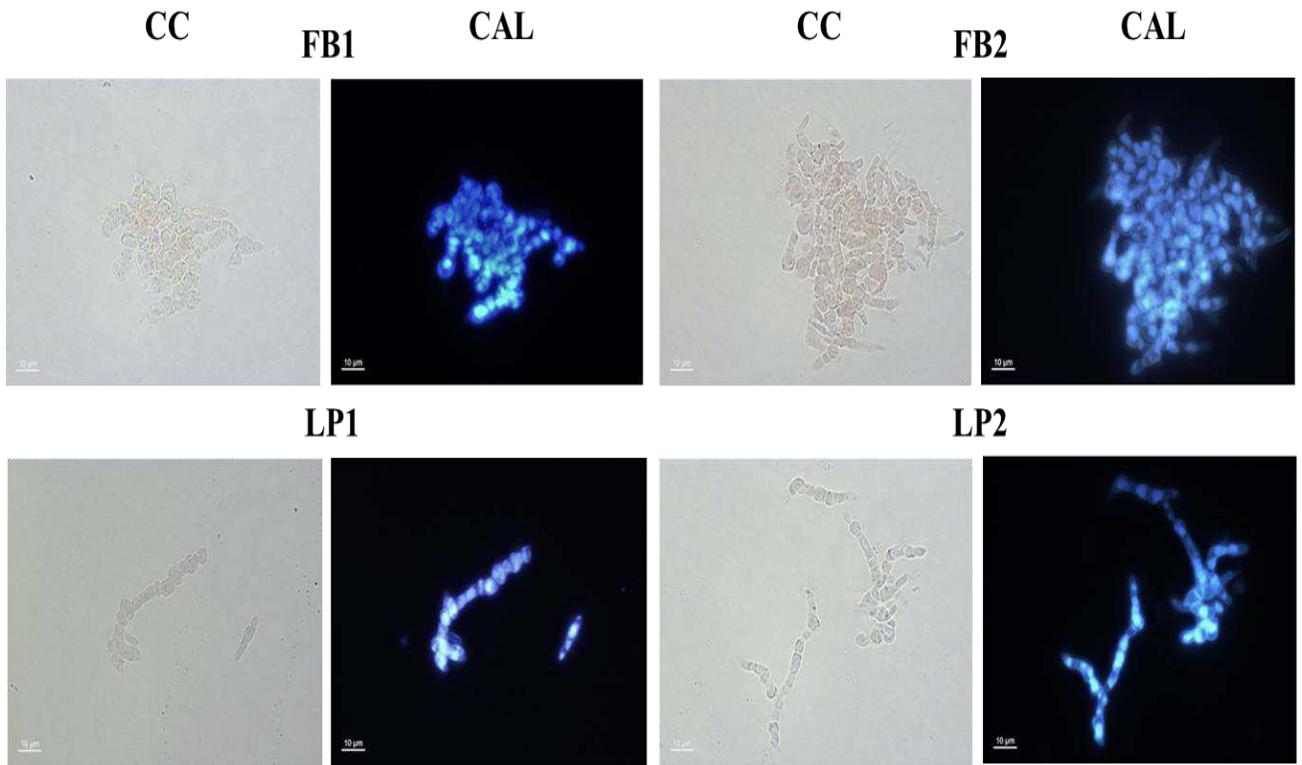
8.3.6 Estrés en la pared celular

- Con concentraciones estresantes de blanco de calcofluor, rojo congo, etanol y sorbitol se indujo el estrés a la pared celular (Figura 37). Con el blanco de calcofluor y rojo congo, se observan resultados similares, las cepas silvestres FB1 y FB2 forman un micelio más grueso de lo normal, con múltiples septos y ramificaciones a las 48hrs de incubación, mientras que las mutantes no pueden formar un micelio grande, ni permanecer aglomeradas unas con otras, probablemente por una mala calidad en la deposición de los septos. En el caso del estrés con etanol, las células de FB1 se alargan un poco y permanecen unidas, las células de FB2 se empiezan a alargar hacia lo que será un micelio, y las mutantes se

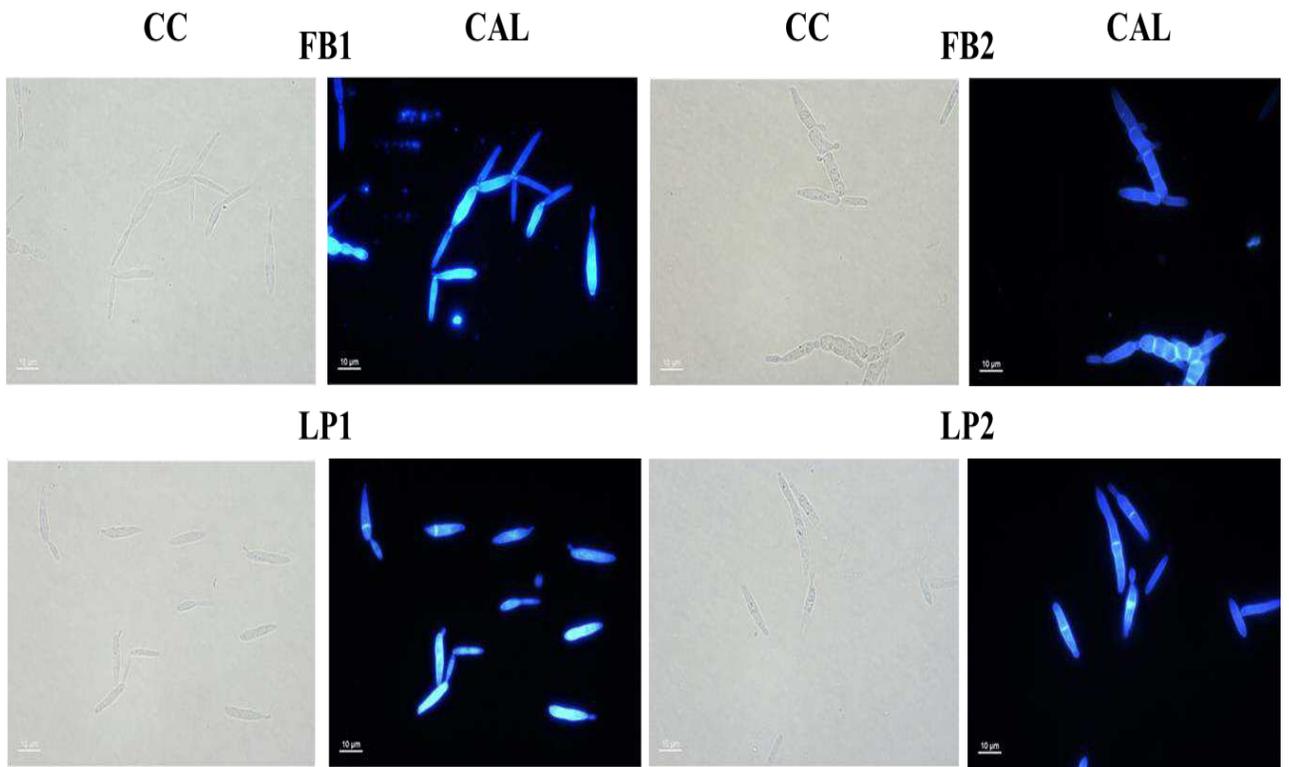
mantienen como levadura. Por último, en presencia de sorbitol las cepas no muestran ninguna diferencia en su tamaño ni en su forma.



ROJO CONGO 10 $\mu\text{g/mL}$



ETANOL 2%



SORBITOL 1M

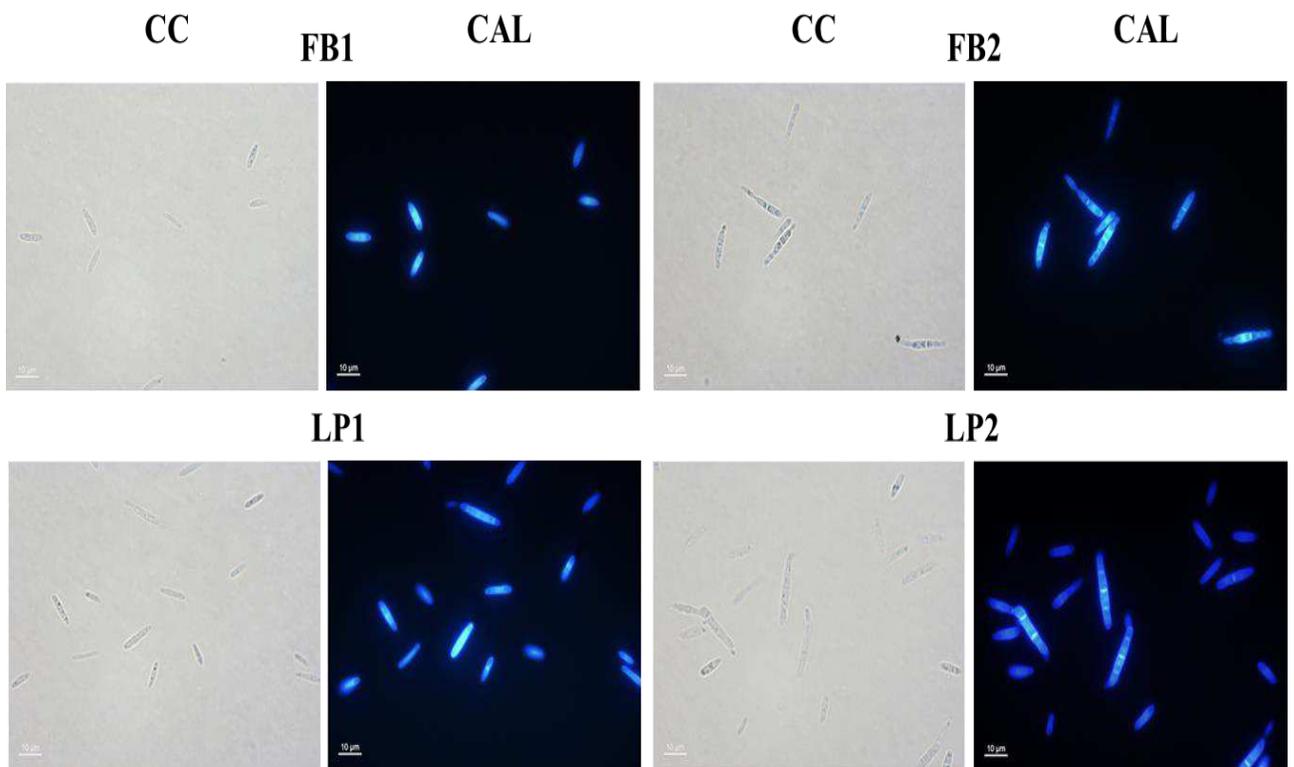
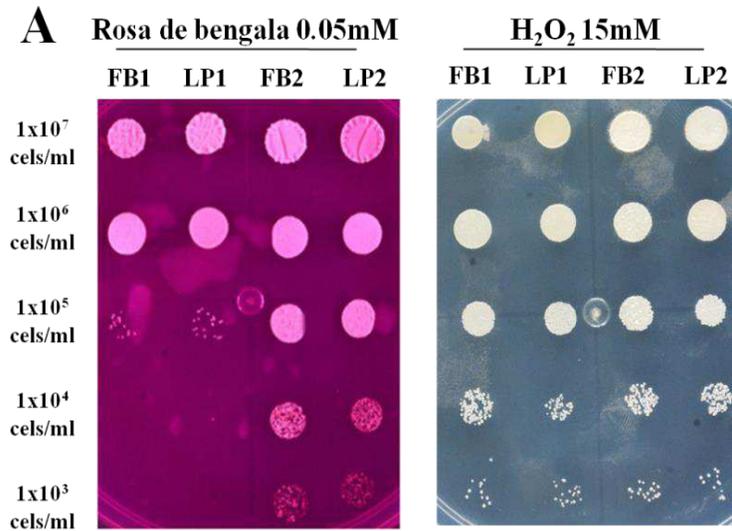


Figura 37. Estrés por pared celular. Estrés a la pared celular de las cepas mutantes LP1 y LP2, y silvestres FB1 y FB2, utilizando calcofluor, rojo congo, etanol y sorbitol en MM pH7 sólido (A) y líquido (B) observadas en campo claro (CC) y calcofluor (CAL). Barra de escala 10 μ m.

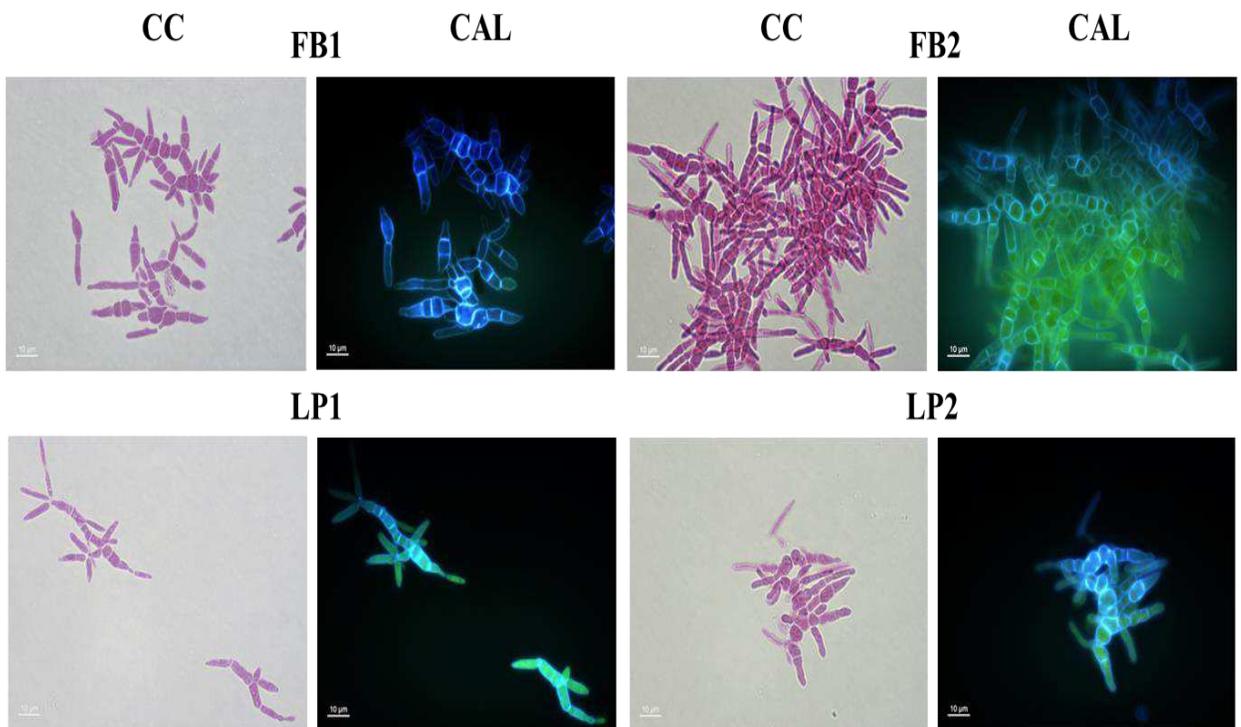
8.3.7 Estrés oxidativo

- El rosa de bengala tiene un efecto oxidativo en las células, en las cepas de *U. maydis* tratadas con este reactivo, vemos que a las 48hrs de incubación en medio líquido, las células de las cepas FB1 y FB2 muestran una morfología diferente. Las células de la cepa FB1 son cortas y septadas; en tanto que las células de la cepa FB2 son más largas y ramificadas, mientras que las cepas mutantes LP1 y LP2 se agregan y son más cortas y delgadas y no forman micelio. En medio sólido, el crecimiento varía ya que en FB1 y LP1 hay una inhibición del crecimiento a las 10⁵cels/mL, y FB2 y LP2 tiene un crecimiento considerable al usar un inóculo de 10³cels/mL. El H₂O₂ induce un alargamiento de las células de la cepa FB2 y un

poco menor en las células de LP2, en comparación con las células de las cepas LP1 y LP2 (Figura 38).



B ROSA DE BENGALA 0.05mM



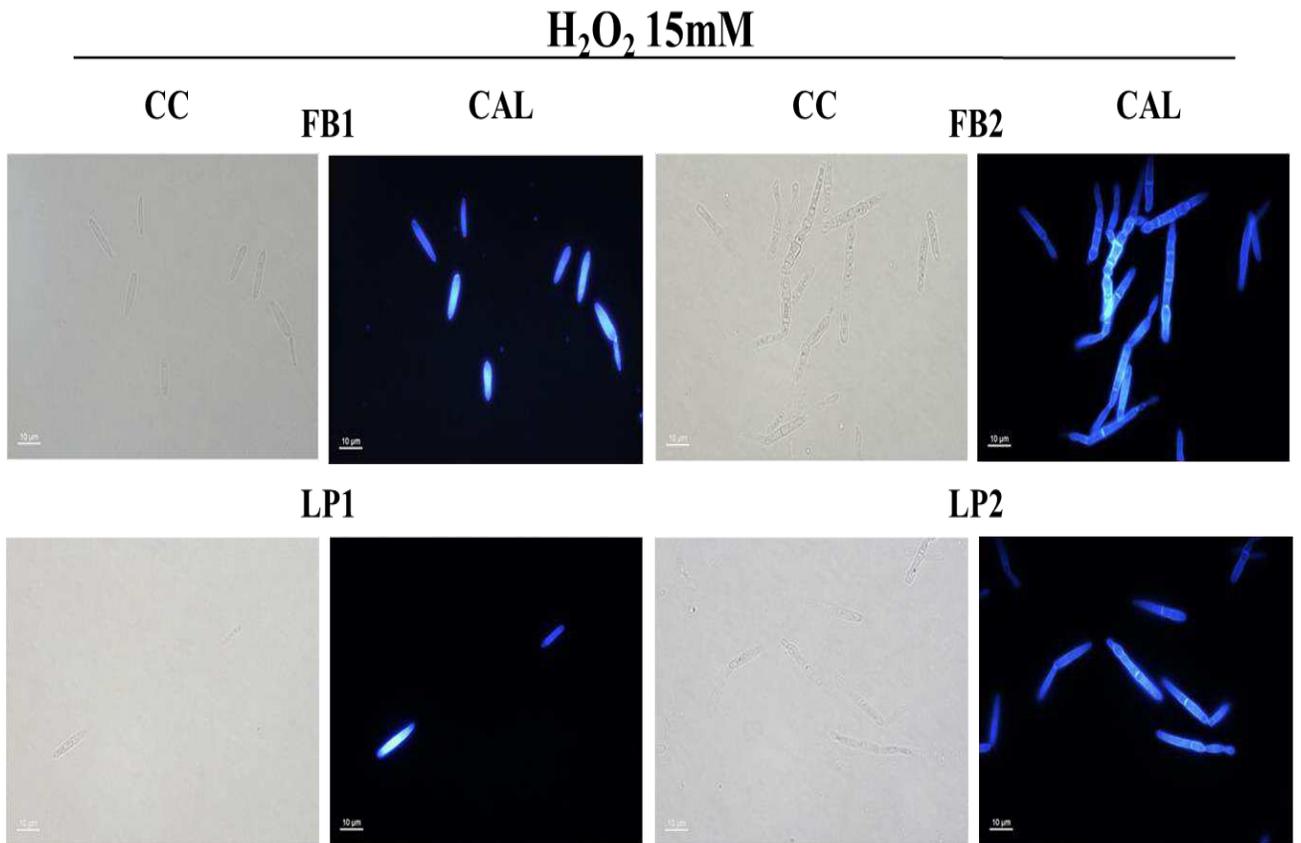


Figura 38. Estrés oxidativo. Tratamiento con agentes oxidantes en medio sólido (A) y en medio líquido (B) usando rosa de bengala y H₂O₂ observadas en campo claro (CC) y con calcofluor (CAL). Barra de escala 10μm.

8.3.8 Estrés por radiación UV

- Las células fueron irradiadas con 500μJ/cm² tanto las que fueron inoculadas en medio sólido, como en medio líquido, y después de 48hrs las células no presentaron ninguna dificultad para crecer (Figura 39). Microscópicamente, las células se mantienen levaduriforme sin formar ninguna estructura diferente.

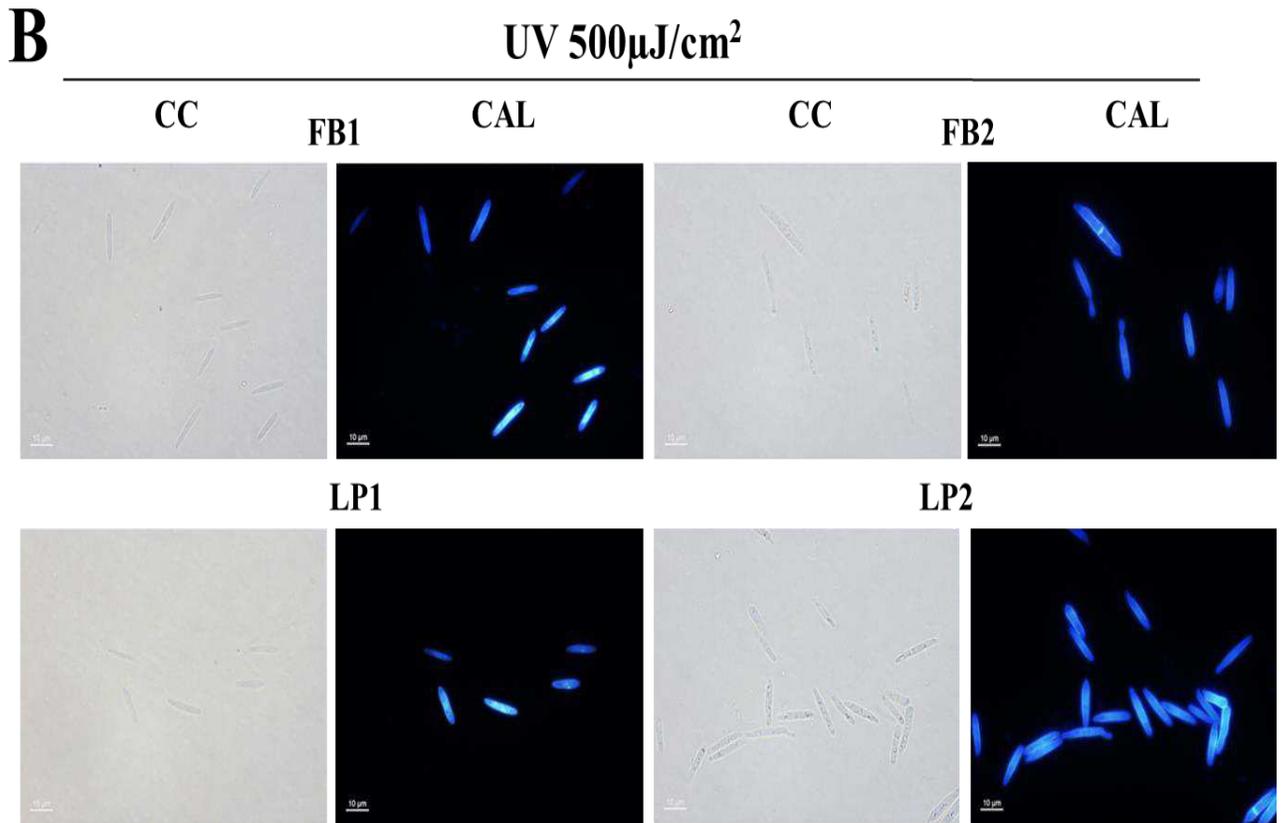
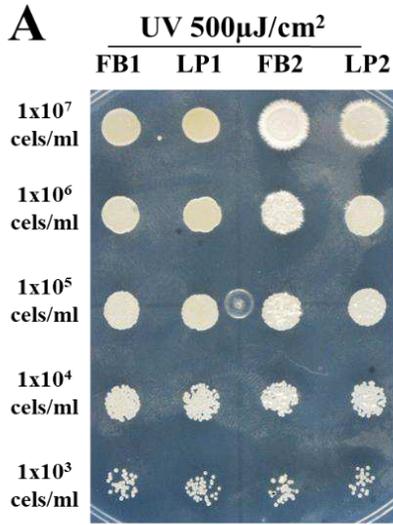


Figura 39. Estrés por radiación UV. Crecimiento en medio sólido (A) y microscopía de las cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 después de 48hrs de ser irradiadas con luz UV observadas en campo claro (CC) y con calcofluor (CAL) (B). Barra de escala 10 μ m.

Transición dimórfica levadura – micelio

8.3.9 Dimorfismo inducido por pH ácido

- Se utilizó MM pH3 para observar el dimorfismo y un control a pH 7 tamponados con regulador. En todos los casos, se observó que a las 48hrs en un medio con pH3 existe la formación del micelio, sin embargo, en el caso de las mutantes LP1 y LP2 el micelio es mucho más corto y pequeño. En FB1 y LP1 el micelio parece ser más ramificado y delgado mientras que en FB2 y LP2 el micelio muestra en algunas partes formas más redondas. A pH 7 las cuatro cepas se mantienen en su forma levaduriforme (Figura 40).

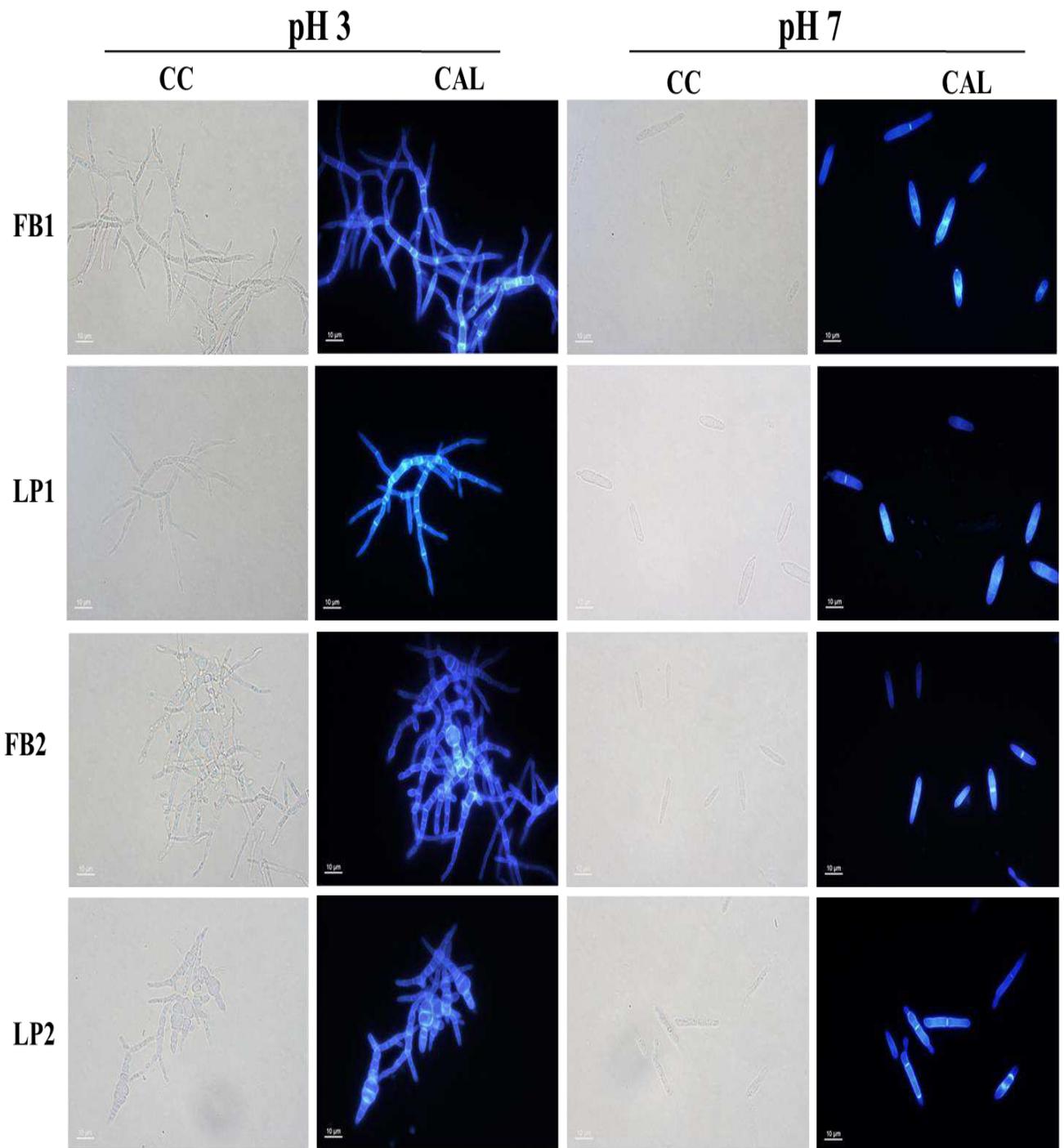


Figura 40. Dimorfismo inducido por pH ácido. Diferencias en la formación de micelio a pH3 de las cepas silvestres FB1 y FB2 contra las mutantes LP1 y LP2 y los controles a pH7 observadas en campo claro (CC) y teñidas con calcofluor (CAL). Barra de escala 10µm.

8.3.10 Dimorfismo inducido por ácidos grasos

- Se utilizó Tween-40 al 1% como fuente de carbono para inducir el dimorfismo. Después de incubarlas por cinco días, las células se observaron al microscopio. Los resultados obtenidos muestran que las cepas mutantes tienen dificultad para poder formar los filamentos largos como las silvestres. Como se ve en la figura 41 FB1 y FB2 forman, aunque en diferente proporción, filamentos delgados y largos, en comparación con las mutantes donde LP1 no muestra indicios de la formación de filamentos, y la cepa LP2 forma menos filamentos que la silvestre correspondiente. El control a pH 7 y con glucosa como única fuente de carbono, aún a los cinco días, siguen manteniendo su forma de levadura, aunque con la formación de vacuolas.

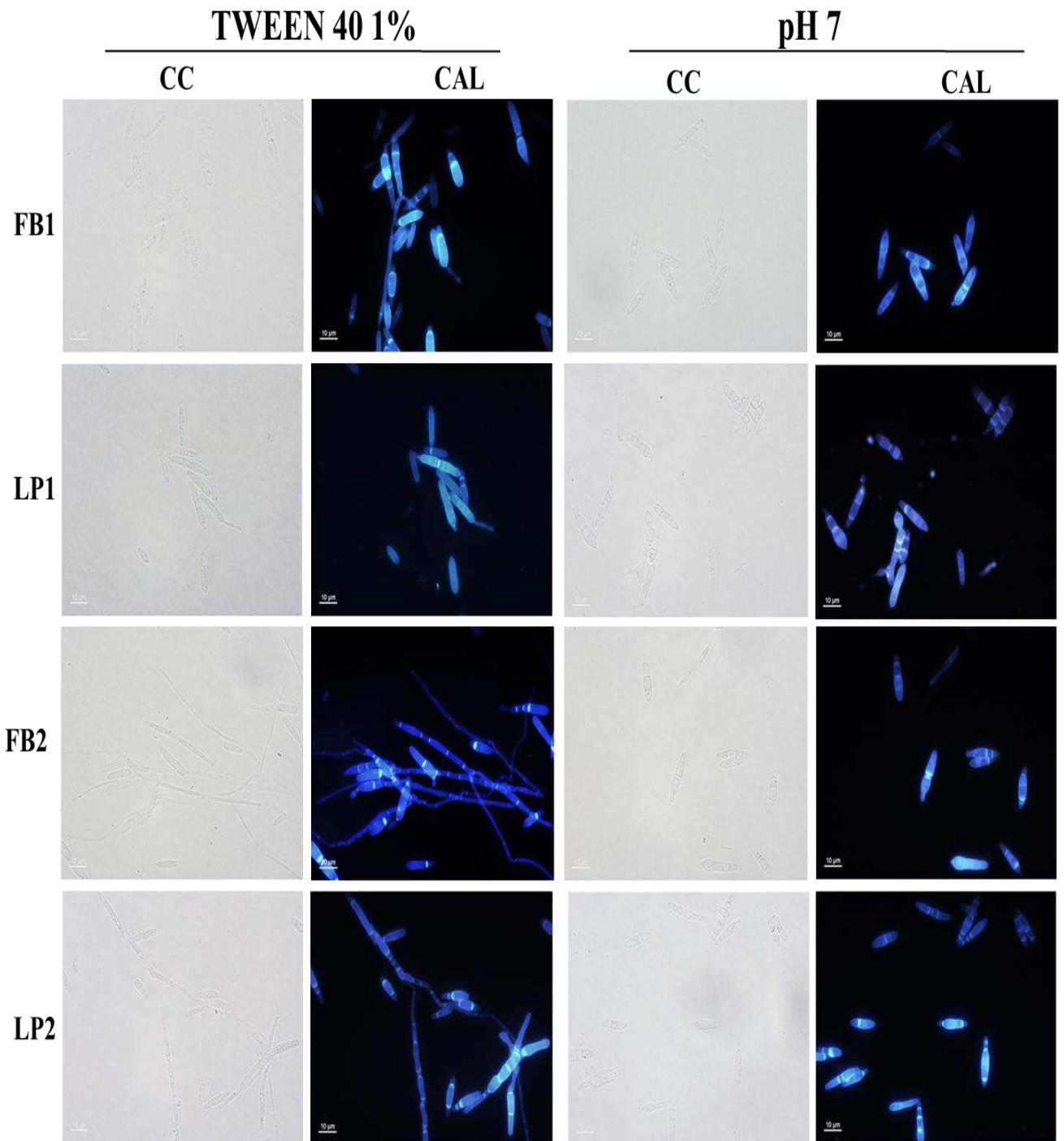


Figura 41. Dimorfismo inducido por ácidos grasos. Formación de filamentos en presencia de palmitato utilizando Tween-40 1% y el control en pH7 con glucosa como única fuente de carbono examinados con campo claro (CC) y con calcofluor (CAL). Barra de escala 10µm.

8.3.11 Dimorfismo inducido por el acetato como fuente de carbono

- Adicionando acetato de sodio 1% en el medio, las cepas silvestres FB1 y FB2 forman filamentos delgados y largos muy parecidos a los formados con Tween-40. Por el contrario, la diferencia reside en las mutantes que, en este caso, ninguna de las dos tiene la capacidad de formar filamentos (Figura 42). Esto nos indica que la fuente de carbono utilizada para observar la formación de filamentos puede estar ligada a la actividad de las septinas de alguna manera. A pH 7, las células se mantienen en forma de levadura.

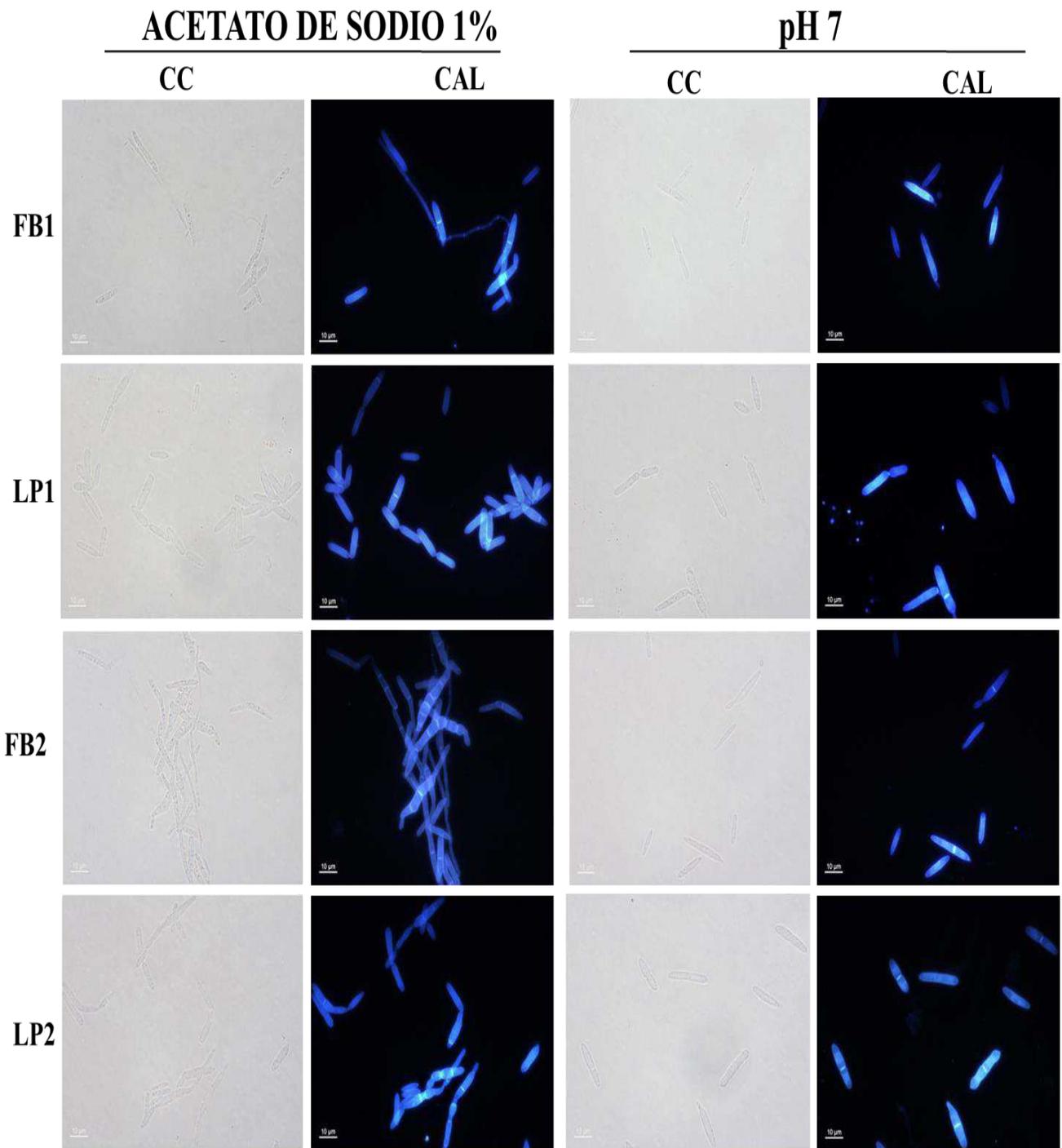


Figura 42. Dimorfismo inducido por el acetato como fuente de carbono. Cepas FB1, FB2, LP1 y LP2 analizadas en campo claro (CC) y con calcofluor (CAL) en presencia de acetato de sodio 1% y como control a pH7 con glucosa como única fuente de carbono. Barra de escala 10µm.

8.3.12 Capacidad de apareamiento por la técnica de Fuzz

- Antes de llevar a cabo los ensayos de virulencia en plantas, se determinó la capacidad de apareamiento de las mutantes y para ello se usó la técnica de Fuzz (Banuett y Herskowitz, 1989). Sobre placas de medio sólido con carbón activado, se inocularon gotas sobrepuestas de las cepas complementarias sexualmente, y como se puede observar visualmente en las placas (Figura 43) las colonias formadas por las mezclas de las cepas de FB1 y FB2, y LP1 y FB2 forman una colonia blanca y algodonosa, lo que indica que ambas se aparean (Fuzz+). Por el contrario, las colonias formadas por la cruza entre LP1 y LP2, y LP2 y FB1 aparecían brillantes y lisas indicando su incapacidad de aparearse (Fuzz-).

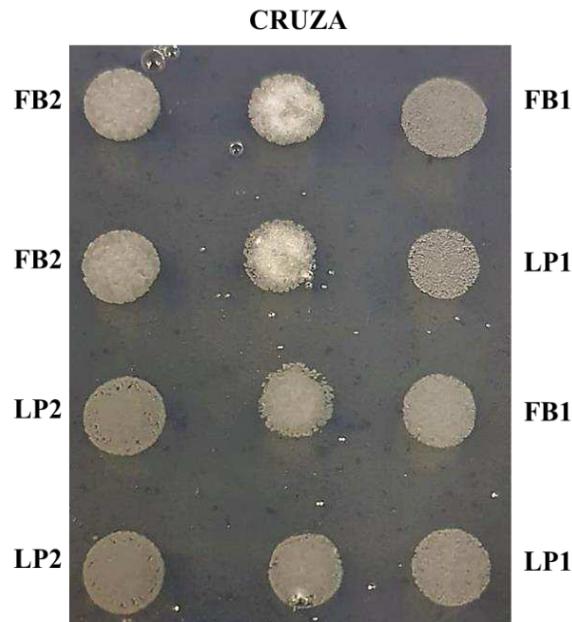


Figura 43. Fuzz entre las cepas silvestres y mutantes. Reacción Fuzz entre las cepas silvestres y mutantes sexualmente compatibles, donde se observa una Fuzz+ entre FB1 y FB2, mientras que en las mutantes LP1 y LP2 es Fuzz-

8.3.13 Capacidad de infección en plantas de maíz

- Las plantas de maíz fueron infectadas al medir ~3 – 5cm de altura con mezclas de cepas las compatibles FB1 x FB2, LP1 x LP2, FB1 x LP2 y FB2 x LP1 y a los 10 días de crecimiento se anotaron las características de las plantas, y se fotografiaron macetas representativas. Se usó la prueba de Friedman para analizar la diferencia entre ensayos excepto en la localización de los tumores y en la diferencia en talla donde se utilizó la prueba de Wilcoxon. Se reservó un control el cual no fue inoculado por lo que a los 10 días no presentaron ningún síntoma de infección. Las plantas presentaron una altura entre mediana y alta, ausencia de clorosis, antocianinas y tumoración a lo largo de la planta y con una talla normal (Figura 44A). Con FB1 x FB2 las plantas se mantienen mayormente medianas y la presencia de antocianinas y clorosis es poca, a diferencia de los tumores que en su mayoría son de tamaño grande y se concentran en el tallo y aun así su talla es preferentemente normal (Figura 44B).
- En cuanto a la mezcla entre las cepas LP1 x LP2 se obtuvieron plantas de tamaño mediano en su mayoría, también una presencia media de clorosis y antocianinas y los tumores son medianos y tienden a presentarse en tallo, pero también más en la hoja, y por último la mayoría son enanas (Figura 44C). La mayor presencia de clorosis y antocianinas en las plantas infectadas con las mutantes que con las silvestres, puede deberse a que desarrolla preferentemente estos síntomas por su incapacidad de formar tumores grandes.
- Observando las plantas infectadas con las cepas FB1 x LP2, se vieron las plantas más altas de todas, abunda la clorosis baja y una presencia de antocianinas media, aunque también son las que presentan mayor cantidad de antocianinas a comparación de las demás mezclas, los tumores formados oscilan entre medianos y grandes distribuidos en el tallo y hoja y en su mayoría son de talla normal (Figura 44D).
- Con las cepas FB2 x LP1, las plantas son en su mayoría medianas y la presencia de clorosis y antocianinas se mantuvo entre poca y media, los tumores generados son

medianos presentes en tallo y hojas y hay una proporción igual entre plantas de talla enana y normal (Figura 44E).

- Las plantas infectadas con alguna de las cepas mutantes formaron tumores medianos localizados en tallo y a diferencia de las infectadas con las cepas silvestres, se encontraron más tumores en las hojas. Si las cepas mutantes, tienen una dificultad o el desarrollo de hifas o filamentos es más lento, puede ser la razón de infectar más a las hojas por ser un tejido más blando y que los tumores no sean tan grandes.



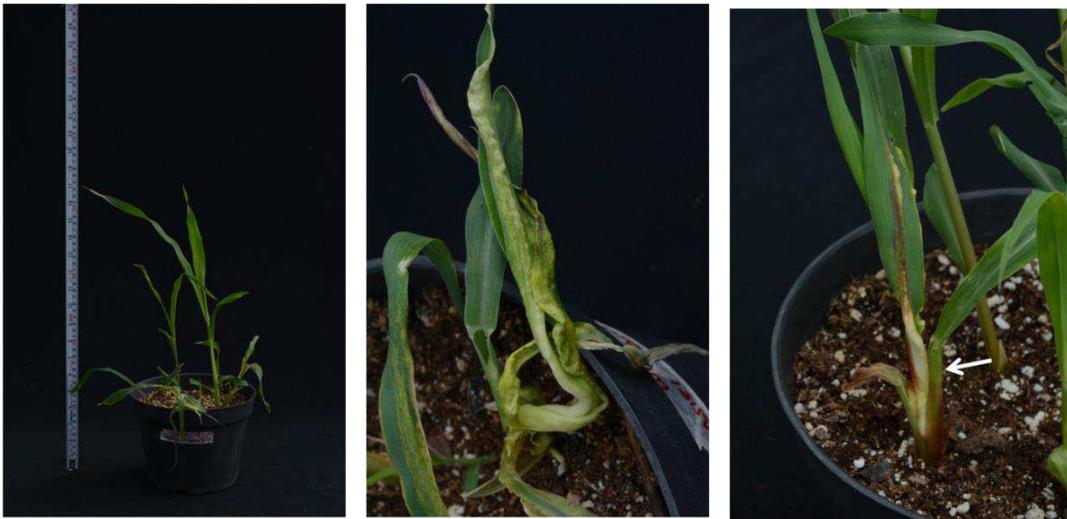
B

FB1 x FB2



C

LP1 x LP2



D**FB1 x LP2****E****FB2 x LP1**

Figura 44. Síntomas de la infección por *U. maydis* en plantas de maíz. Sintomatología de las plantas de maíz infectadas con las diferentes mezclas de cepas FB1 x FB2 (B), LP1 x LP2 (C), FB1 x LP2 (D) y FB2 x LP1 (E) donde se muestra la formación de tumores en las diferentes partes de la planta, la presencia de antocianinas y clorosis, su altura y la talla que tienen a diferencia del control (A) que no presenta síntomas.

Tabla 13. Tamaño de plantas de maíz. Medición cuantitativa del tamaño de las plantas de maíz infectadas con las cepas de *U. maydis*.

Tamaño	Pequeñas (5-19cm)	Medianas (20-39cm)	Grandes (40-60cm)
FB1 x FB2⁺	4	21	2
LP1 x LP2⁺	8	13	5
FB1 x LP2⁺	10	11	8
FB2 x LP1⁺	8	13	5

+Chi² – 1.000, Sig. – 0.801

Tabla 14. Presencia de antocianinas en plantas de maíz. Medición cualitativa de la presencia de antocianinas en las plantas de maíz provocado por la infección con *U. maydis*

Antocianinas	Pocas (+)	Media (++)	Abundante (+++)
FB1 x FB2⁺	13	10	4
LP1 x LP2⁺	9	14	3
FB1 x LP2⁺	9	13	7
FB2 x LP1⁺	11	13	2

+Chi² – 0.321, Sig. – 0.956

Tabla 15. Presencia de clorosis en plantas de maíz. Abundancia de clorosis en las plantas de maíz infectadas.

Clorosis	Poca (+)	Media (+)	Abundante (+++)
FB1 x FB2⁺	16	11	0
LP1 x LP2⁺	10	16	0
FB1 x LP2⁺	17	12	0
FB2 x LP1⁺	13	12	1

+Chi² – 1.080, Sig. – 0.782

Tabla 16. Tamaño y localización de tumores en plantas de maíz. Presencia de tumores en las plantas de maíz infectadas clasificados por su tamaño y localización.

Tumor	TAMAÑO			LOCALIZACIÓN			
	CH ^a	M ^a	G ^a	Tallo ^b	Hoja ^b	T y H	Ausencia
FB1 x FB2	5	7	17	19	10	8	5
LP1 x LP2	6	20	8	21	14	13	4
FB1 x LP2	3	18	14	17	18	9	3
FB2 x LP1	6	19	14	18	21	15	2

aChi² – 1.607, Sig. – 0.658

bZ – -0.730, Sig. 0.465

Tabla 17. Talla de las plantas de maíz. Clasificación de las plantas de maíz infectadas por su talla normal o enana.

Talla	Normal (planta con elongación)	Enanas (dobladas y poco desarrollo)
FB1 x FB2⁺	16	10
LP1 x LP2⁺	12	14
FB1 x LP2⁺	18	11
FB2 x LP1⁺	13	13

+Z – -1.069, Sig. – 0.285

IX. DISCUSIÓN

Las modificaciones postraduccionales juegan un papel crítico en la adaptación celular, crecimiento, diferenciación y desarrollo de todos los organismos. La sumoilación es una modificación que ha tomado importancia por su participación en los procesos patológicos de los hongos (Leach y Brown, 2012). Se caracteriza por la adición de una proteína llamada SUMO (small ubiquitin-like modifier) de 12kDa que pertenece a una familia de proteínas altamente conservada en todos los eucariotes y que afecta en la interacción, localización, estabilidad o actividad de muchas proteínas (Melchior *et al.*, 2003; Johnson, 2004). Fue descrita por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con su homólogo Smt3 (Zhou *et al.*, 2004), mientras que en el hongo Basidiomycota *Ustilago maydis*, o en algún basidiomiceto, no se ha descrito ni relacionado esta vía de sumoilación con su funcionalidad. En este trabajo, se demostró *in silico* la presencia de los componentes que son necesarios para la actividad de SUMO: SUMO, Aos1, Uba2, Ubc9, Siz1, Ulp1 y Ulp2 en *U. maydis* y que son necesarios para la actividad de SUMO.

Diseñando sondas aminoacídicas, se encontró un único gen correspondiente a SUMO (UMAG_05863). Esta proteína contiene dos residuos de glicina hacia el extremo C – terminal, que son clave para su actividad al unirse con la proteína blanco (Johnson, 2004). En nuestro análisis se encontró que el extremo C – terminal difería en cada una de las secuencias salvo por estos dos residuos de glicina, presentes también en la secuencia de *U. maydis*. La región más conservada en SUMO, y a la que fue dirigida la sonda, fue en la que se encuentra localizada el dominio de UBQ (figura 7) donde todas las proteínas parecidas a ubiquitina contienen este dominio conservado y que comparten una similitud del ~18% con la ubiquitina (Johnson 2004; Zhao y Blobel, 2005).

En el heterodímero Aos1 (UMAG_01081) y Uba2 (UMAG_01001) encontramos el dominio ThiF que le ayuda a unir ATP y formar el enlace tiolester entre SUMO y Uba2 (Lim *et al.*, 2018). Para la enzima de conjugación E2 (UMAG_04542) se ha reportado que contiene un dominio altamente conservado incluso en humanos (Yasugi y Howley 1996) característico de las proteínas de la familia UBCC, el cual es el encargado de encontrar el motivo conservado en la proteína que se quiere modificar y que es esencial para la

viabilidad (Maeda et al., 2004). En nuestros resultados se encontró que la sonda dirigida a Ubc9 es la que presentó mayor porcentaje de similitud con un 82% (tabla 8), lo que concuerda con lo descrito anteriormente y que, en efecto, esta enzima debe ser de vital importancia para llevar a cabo la sumilación.

Siz1 en *S. cerevisiae* tiene tres dominios: SAP, PINIT y SP-RING (Yunus y Lima, 2009), y lo que se encontró al analizar la secuencia de Siz1 en *U. maydis* fueron los dominios PINIT y SP-RING que se ha reportado son fundamentales para su acción, incluso el sitio de unión del ión zinc está presente en esta secuencia (Reindle et al. 2006; Yunus y Lima, 2009). El dominio SAP le ayuda a unirse al ADN, por esto no es esencial para estimular la sumoilación sobre las septinas, pero si tiene un efecto modificando el PCNA (Reindle et al. 2006) aunque se ha descrito que Siz1 puede sumoilar el PCNA pero no es totalmente requerido para su unión con el ADN, donde lleva a cabo su función (Parker et al., 2008) y por esta razón puede que no esté presente este dominio en *U. maydis*. Al teñir con DAPI en las cinéticas de crecimiento, solamente a pH 7 y pH9 en el tiempo 48, se observa una masa de ADN más pequeña y no tan definida en algunas células, y esto se ha visto en dobles mutantes de *S. cerevisiae* *siz1-Δ0 siz2-Δ0* en fase G2/M (Strunnikov et al., 2001). Al no utilizar ninguna técnica de sincronización de las células, como el estrés nutritivo, no podemos estar muy seguros de la fase en que iniciaron las células el crecimiento, no obstante, este defecto en los núcleos puede deberse al tiempo y la acumulación de fallas por la falta de Siz1 y además como no presentaron un retraso significativo en el crecimiento, puede que otros factores estén interviniendo en el funcionamiento del PCNA, como Siz2 (Klein, 2006).

Los últimos dos componentes Ulp1 y Ulp2, son los encargados de la desumoilación con un dominio similar que es el de peptidasa C48 que van a liberar a SUMO de la proteína blanco. *U. maydis* cuenta con las dos enzimas Ulp1 y Ulp2, y que Ulp2 se ha caracterizado por ser la más importante de las dos y específico de SUMO (Schwienhorst et al., 2000). La diferencia encontrada entre estos dos es que en Ulp1 el dominio se encuentra hacia el extremo C-terminal, y Ulp2 hacia el N-terminal, sin embargo, esto es propio de las isopeptidasas C48, ya que esto les concede actividad para diferentes sustratos (Yeh, 2009).

Para la generación de mutantes, se partió de un casete de interrupción diseñado con la técnica de Double-Joint PCR, que tiene una eficiencia de transformación obtenida en otros hongos, dependiendo de la longitud de los fragmentos generados, que va de un 2 – 20% (Yu *et al.*, 2004). Para incrementar la probabilidad de recombinación se utilizó la técnica de triple recombinación “Split-marker” descrita por Catlett y colaboradores (2003), que se ha reportado más efectiva (You *et al.*, 2009). En nuestras transformaciones se obtuvo un 5% de eficiencia de recombinación, y esto se podría deber al método de transformación utilizado, donde en otros reportes utilizan biolística o electroporación (Fu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009). Sin embargo, You y su equipo (2009) emplean protoplastos, al igual que nuestro caso, obteniendo hasta un 50% de efectividad, por lo que la baja eficiencia obtenida en este trabajo puede depender más de la importancia del gen que se está interrumpiendo (Yu *et al.*, 2004).

Para llevar a cabo una gemación y citocinesis exitosa en la célula, se requiere de la formación de septos, donde el mayor componente durante este proceso son las septinas (Johnson y Gupta, 2001; Böhmer *et al.*, 2009; Douglas *et al.*, 2005) las cuales sufren modificaciones como la sumoilación para llevar a cabo su función correctamente (Johnson y Gupta, 2001). Se ha visto que es indispensable la presencia de Siz1 para la sumoilación de las septinas *in vivo*, pero *in vitro*, Siz1 estimula la sumoilación en diferente proporción (Takahashi *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2003).

Al realizar las cinéticas de crecimiento a los diferentes pH's vemos que no existen cambios morfológicos por parte de las cepas, donde se esperaba que, al menos a pH ácido (pH 4) las células pudieran sufrir dimorfismo (Ruiz-Herrera *et al.*, 2005), sin embargo, al igual que en los demás pH's, *U. maydis* tiende a adaptar su medio a pH 8, incluyendo las mutantes, que solamente a pH4, su adaptación fue un poco más lenta que llegaron a un pH de 7.5. Al observar los factores de transcripción que interaccionan con el promotor de *SIZ1*, vemos que está presente el factor Nrg1 que, regulando a Rim101, interviene en la adaptación del pH (Lamb y Mitchell, 2003), Basándonos en las cinéticas de proteína, a pH4 es más notorio el menor crecimiento de las mutantes LP1 y LP2, y podemos pensar que la mutación impide su buen crecimiento como se ha descrito anteriormente (Johnson y Gupta, 2001), no obstante, es el único pH en el que se muestra este comportamiento tan evidente,

entonces puede deberse a la dificultad de adaptar y cambiar tanto el pH de su medio y con esto tiene sentido que Siz1 se encuentre activo a pH ácido en *U. maydis* (Franco Farías, 2014).

Se ha reportado que los niveles de sumoilación en la célula suelen ser bajos en ausencia de algún tipo de estrés (Zhou *et al.*, 2004). En los tratamientos de respuesta a estrés, macroscópicamente todas las cepas crecen al mismo nivel, evidenciando que la ausencia del Siz1 no limita el crecimiento de *U. maydis* aún en condiciones estresantes o, al menos, en las condiciones demostradas en este trabajo. Las diferencias observadas fueron a nivel microscópico únicamente, por ejemplo, la presencia de múltiples septos en diferentes zonas en las cepas mutantes en medio MC, pueden ser rastros de un intento de división celular fallido, ya que la integridad de las septinas es necesaria para una citocinesis correcta (Johnson y Gupta, 2001).

En las tres variantes de temperatura probadas, no se obtuvieron diferencias muy relevantes. A 30°C las células crecen en forma de levadura, estando esta temperatura en su rango ideal, mientras a 37°C se presentan con una morfología alargada poco común, sin embargo, no hay diferencias entre las cepas mutantes y silvestres. A 20°C, se ha descrito que mutantes en el gen *SIZ1* en *S. cerevisiae* son sensibles a estas temperaturas bajas (Johnson y Gupta, 2001), a pesar de esto, en *U. maydis* las mutantes no presentan sensibilidad alguna ni cambios morfológicos.

Desde hace décadas, se ha descrito que el pH ácido induce el dimorfismo en *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995), y es lo que se observa en el tratamiento a pH 3 donde todas las cepas tienen la capacidad de formar micelio, interesantemente, el micelio que forman las mutantes son más pequeños y cortos. Algo parecido observamos estresando la pared celular del hongo con rojo congo y calcofluor, y con un agente oxidante como el rosa de bengala. Esta característica puede ser dada por una falla en la actividad de las septinas que no le permite un buen ensamblaje entre ellas y el crecimiento del micelio es menor.

En diferentes ocasiones, se ha descrito que el H₂O₂ es el mayor inductor de la sumoilación, junto con el etanol (Zhou *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2018), en nuestros resultados, *U. maydis* no muestra un decremento en el crecimiento ni sensibilidad a estos compuestos. Pueden diferir los resultados por las concentraciones utilizadas, o por la

existencia de otros componentes que activan a SUMO, ya que los analizados en este trabajo no son exclusivos.

U. maydis crecido a pH 3, ha mostrado la mayor formación de micelio en comparación de otros pH's (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995), al igual que ocurre al usar un ácido graso, como palmitato como fuente de carbono, muestra la formación de filamentos ramificados (Klose *et al.*, 2004). En 48hrs, obtuvimos en las cepas silvestres un micelio abundante y largo, y en el caso de las mutantes, el micelio formado es más pequeño y corto, y, además, las hifas parecen no poder mantenerse unidas. El mismo patrón se observa en los ensayos con Tween-40 y acetato de sodio, donde la formación de filamentos largos y delgados por parte de FB1 y FB2 es mayor a comparación de las mutantes, que es casi nula. Resultados similares se obtuvieron en mutantes del gen *SEP3*, que es una septina de *U. maydis*, con la ausente formación de micelio en presencia de Tween-40 1% (Boyce *et al.*, 2005). Cabe destacar que en el análisis de promotor se encontró que el factor de transcripción Tec1 interacciona con el promotor de *siz1*, que está involucrado en la formación de filamentos (Oehlen y Cross, 1998). Con esto, podemos decir que la mutación en *siz1* afecta la calidad e integridad de algunas septinas, lo que impide que pueda formar hifas alargadas en respuesta a pH ácido, palmitato y acetato de sodio.

En los ensayos de virulencia en plantas de maíz, se observó en el 100% los síntomas de infección característicos de *U. maydis* que son la presencia de clorosis y antocianinas (Banuett, 1995), aun cuando pocas plantas no presentaron tumores. Incluso cuando las pruebas estadísticas de Friedman y Wilcoxon mostraron que no existen diferencias significativas entre las plantas infectadas, se observan ciertas tendencias. Interesantemente, las plantas con la cruce de las cepas silvestres FB1 x FB2, mostraron la mayor ausencia de tumores, y en las demás cruces donde están presentes las mutantes, hay menor ausencia. Entonces, la falla parece presentarse en la etapa tardía de la infección posterior a la penetración, incluso, se ha relacionado a SUMO, E1 y E2 en la formación del apresorio en *M. oryzae*, pero no a *siz1* (Lim *et al.*, 2018). Siendo las septinas parte importante del proceso de infección (Boyce *et al.*, 2005; Álvarez y Pérez, 2010) y al ser aberrantes por la falta de sumoilación en LP1 y LP2, los tumores son más pequeños y se presentan en las hojas con mayor frecuencia probablemente por ser un tejido más blando y fácil de acceder.

Si bien las septinas se encuentran en mayor proporción en la formación de los septos, también se ha demostrado que recluta otras proteínas durante todo el ciclo celular para llevar a cabo la división y citocinesis (Takizawa *et al.*, 2000; Gladfelter *et al.*, 2001; Westfall y Momany 2002), y que además, las septinas sufren otras modificaciones como acetilación y fosforilación (Gladfelter 2010), que hacen que la mutación en *siz1* en *U. maydis* no impida su crecimiento, dimorfismo, infección hacia la planta o cambie su morfología; no obstante, parece ser una parte esencial para la correcta función de las septinas al momento de su ensamblaje y estabilidad en la formación de filamentos o hifas. Con la información obtenida en este trabajo, podemos suponer que *siz1* actúa directamente en las septinas, en específico con Sep3, ya que se ha descrito que modifica a su homólogo Cdc11 en *S. cerevisiae* (Johnson y Gupta, 2001; Pan *et al.*, 2007), y por la concordancia con los resultados mostrados por Boyce y sus colaboradores (2005).

X. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia de los componentes de la vía de sumoilación en *U. maydis* por medio de análisis *in silico*.
2. El genoma de *U. maydis* posee un homólogo del gen *SIZ1*.
3. El gen *siz1* no es esencial para la viabilidad de *U. maydis*.
4. Es posible que *Siz1*, junto con la maquinaria de sumoilación, modifica a las septinas en *U. maydis* comprometiendo la formación y el tamaño de micelios bajo diferentes tipos de estrés como pH ácido, hacia la pared celular con calcofluor y rojo congo, y agentes oxidantes como rosa de bengala.
5. La falta de sumoilación en las septinas de *U. maydis* posiblemente provoca la poca o nula formación de filamentos en presencia de palmitato 1% o acetato de sodio 1%
6. Las mutantes LP1 y LP2 muestran una infección menos agresiva hacia las plantas de maíz, formando tumores más pequeños y dirigidos a tejidos blandos como las hojas.

XI. PESPECTIVAS

Determinar si existe un retraso o alteración por la interrupción de *SIZ1* en las diferentes fases del ciclo celular observando el núcleo al sincronizar las células silvestres y mutantes.

Determinar la localización a Siz1 en las células silvestres y observar los cambios de esta en las mutantes mediante una fusión con proteína de fluorescencia.

Demostrar que la ausencia de Siz1 altera a las septinas de *U. maydis*.

Evaluar si la interrupción de *SIZ1*, debilita en cierta proporción a la pared celular midiendo su sensibilidad con enzimas líticas.

Obtener otras mutantes sencillas o dobles mutantes interrumpiendo los genes involucrados en los demás pasos de la sumoilación para observar su impacto.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Tabarés, I., & Pérez-Martín, J. 2010. Septins from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* are required for proper morphogenesis but dispensable for virulence. *PLoS One*, 5(9), e12933.

Aréchiga, E. T. 2005. The *Rim101/PacC* homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* Is Functional in Multiple pH-Sensitive Phenomena, 4(6), 999–1008.

Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual review of genetics*, 29(1), 179-208.

Banuett, F., & Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(15), 5878-5882.

Beas, F., Loarca, P., Guzmán, M., Horacio, S., Rodríguez, M. G., Vasco, M., ... & Guevara, L. 2011. Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona centro de México. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(2), 36-44.

Böhmer, C., Ripp, C., & Bölker, M. 2009. The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 74(6), 1484-1496.

Bölker, M. 2001. *Ustilago maydis*—a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147(6), 1395-1401.

Boyce, K. J., Chang, H., D'Souza, C. A., & Kronstad, J. W. (2005). An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. *Eukaryotic cell*, 4(12), 2044-2056.

Brachmann, A., König, J., Julius, C., & Feldbrügge, M. 2004. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(2), 216-226.

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., & Kahmann, R. 2009. *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual review of phytopathology*, 47, 423-445.

Bylebyl, G. R., Belichenko, I., & Johnson, E. S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44113-44120.

Castaño-Miquel, L., Mas, A., Teixeira, I., Seguí, J., Perearnau, A., Thampi, B. N., ... & Coca, M. 2017. SUMOylation inhibition mediated by disruption of SUMO E1-E2 interactions confers plant susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. *Molecular Plant*.

Catala, R., Ouyang, J., Abreu, I. A., Hu, Y., Seo, H., Zhang, X., & Chua, N. H. (2007). The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *The Plant Cell*, 19(9), 2952-2966.

Catlett, N. L., Lee, B. N., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2003). Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Reports*, 50(1), 9-11.

Chen, C. C., Chen, Y. Y., Tang, I. C., Liang, H. M., Lai, C. C., Chiou, J. M., & Yeh, K. C. (2011). Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 is involved in excess copper tolerance. *Plant Physiology*, pp-111.

Dasso, M. 2008. Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell division*, 3(1), 5.

Dohmen, R. J. 2004. SUMO protein modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1695(1), 113-131.

Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., & Kahmann, R. 2004. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology*, 7(6), 666-672.

Ferreira, H. C., Luke, B., Schober, H., Kalck, V., Lingner, J., & Gasser, S. M. 2011. The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast. *Nature Cell Biology*, 13(7), 867-874.

Franco Farías, E. (2014). Caracterización de la expresión génica en respuesta a estrés alcalino en *U. maydis* mediada por el factor de transcripción Rim101/PacC (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Finn, R.D. Coggill, P. Eberhardt, R.Y. Eddy, S.R. Mistry, J. Mitchell, A.L. Potter, S.C. Punta, M. Qureshi, M. Sangrador-Vegas, A. Salazar, G.A. Tate, J. Bateman A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44:D279-D285.

Fu, J., Hettler, E., & Wickes, B. L. (2006). Split marker transformation increases homologous integration frequency in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(3), 200-212.

Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(12), nrm2293.

Gill, G. 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Current opinion in genetics & development*, 15(5), 536-541.

Girdwood, D. W., Tatham, M. H., & Hay, R. T. 2004. SUMO and transcriptional regulation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 15, No. 2, pp. 201-210). Academic Press.

Gladfelter, A. S. 2010. Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology*, 13(6), 720-726.

Gladfelter, A. S., Pringle, J. R., & Lew, D. J. (2001). The septin cortex at the yeast mother–bud neck. *Current opinion in microbiology*, 4(6), 681-689.

Gomes, F. M., Ramos, I. B., Wendt, C., Girard-Dias, W., De Souza, W., Machado, E. A., & Miranda, K. 2013. New insights into the in situ microscopic visualization and

quantification of inorganic polyphosphate stores by 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-staining. *European Journal of Histochemistry*, 57(4), 34.

Gonçalves, A. B., Santos, I. M., Paterson, R. R. M., & Lima, N. 2006. FISH and Calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. *Revista iberoamericana de micología*, 23(3), 194-198.

Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.

Hammond, T. M., Xiao, H., Rehard, D. G., Boone, E. C., Perdue, T. D., Pukkila, P. J., & Shiu, P. K. 2011. Fluorescent and bimolecular-fluorescent protein tagging of genes at their native loci in *Neurospora crassa* using specialized double-joint PCR plasmids. *Fungal Genetics and Biology*, 48(9), 866-873.

IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp

Johnson, E. S. 2004. Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 355-382.

Johnson, E. S., & Gupta, A. A. 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106(6), 735-744.

Kahmann, R., & Kämper, J. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist*, 164(1), 31-42.

Kämper, J. 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1), 103-110.

Kim, M. S., Kim, S. Y., Jung, K. W., & Bahn, Y. S. 2012. Targeted gene disruption in *Cryptococcus neoformans* using double-joint PCR with split dominant selectable markers. *Host-Fungus Interactions: Methods and Protocols*, 67-84.

Kim, M. S., Kim, S. Y., Yoon, J. K., Lee, Y. W., & Bahn, Y. S. 2009. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 983-988.

Klein, H. L. (2006). A SUMOry of DNA replication: synthesis, damage, and repair. *Cell*, 127(3), 455-457.

Klose, J., De Sá, M. M., & Kronstad, J. W. (2004). Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 52(3), 823-835.

Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., ... & Vierstra, R. D. 2003. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis* accumulation of sumo1 and-2 conjugates is increased by stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6862-6872.

Lamb, T. M., & Mitchell, A. P. 2003. The Transcription Factor Rim101p Governs Ion Tolerance and Cell Differentiation by Direct Repression of the Regulatory Genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*, 23(2), 677–686.

Leach, M. D., & Brown, A. J. 2012. Posttranslational modifications of proteins in the pathobiology of medically relevant fungi. *Eukaryotic cell*, 11(2), 98-108.

Leaper, S., Resnick, M. A., & Holliday, R. (1980). Repair of double-strand breaks and lethal damage in DNA of *Ustilago maydis*. *Genetics Research*, 35(3), 291-307.

León-Ramírez, C. G., Sánchez-Arreguín, J. A., & Ruiz-Herrera, J. 2014. *Ustilago maydis*, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. *Natural Resources*, 5(8), 256.

Li, S. J., & Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*, 398(6724), 246.

Li, S. J., & Hochstrasser, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Molecular and cellular biology*, 20(7), 2367-2377.

Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919.

Lim, Y. J., Kim, K. T., & Lee, Y. H. (2018). SUMOylation is required for fungal development and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*.

Liu, C., Li, Z., Xing, J., Yang, J., Wang, Z., Zhang, H., ... & Chen, X. L. (2018). Global analysis of sumoylation function reveals novel insights into development and appressorium-mediated infection of the rice blast fungus. *New Phytologist*.

Maeda, D., Seki, M., Onoda, F., Branzei, D., Kawabe, Y. I., & Enomoto, T. (2004). Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S. cerevisiae*. *DNA repair*, 3(3), 335-341.

Melchior, F. 2000. SUMO—nonclassical ubiquitin. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 591-626.

Melchior, F., Schergaut, M., & Pichler, A. 2003. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends in biochemical sciences*, 28(11), 612-618.

Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirm, V., Miura, T., ... & Hasegawa, P. M. (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(4), 1403-1414.

Molina, L., & Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*, 19(7), 2293-2309.

Mostowy, S., & Cossart, P. 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(3), 183-194.

Müller, S., Hoegel, C., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(3), 202-213.

Nie, X., Yu, S., Qiu, M., Wang, X., Wang, Y., Bai, Y., ... & Wang, S. 2016. *Aspergillus flavus* SUMO Contributes to Fungal Virulence and Toxin Attributes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(35), 6772-6782.

Oehlen, L., & Cross, F. R. (1998). The mating factor response pathway regulates transcription of *TEC1*, a gene involved in pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, *429*(1), 83-88.

Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in cell biology*, *33*, 105-110.

Pan, F., Malmberg, R. L., & Momany, M. 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC evolutionary biology*, *7*(1), 103.

Parker, J. L., Bucceri, A., Davies, A. A., Heidrich, K., Windecker, H., & Ulrich, H. D. (2008). SUMO modification of PCNA is controlled by DNA. *The EMBO Journal*, *27*(18), 2422-2431.

Reindle, A., Belichenko, I., Bylebyl, G. R., Chen, X. L., Gandhi, N., & Johnson, E. S. 2006. Multiple domains in Siz SUMO ligases contribute to substrate selectivity. *J Cell Sci*, *119*(22), 4749-4757.

Rios-Holguín, A.L. (2017). Diseño de un casete de interrupción para el gen *siz1* de *Ustilago maydis* mediante la técnica de PCR de Doble Unión (tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L.

Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., & Gill, G. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Molecular cell*, *10*(4), 831-842.

Ruiz-Herrera, J., León, C. G., Guevara-Olvera, L., & Cárabez-Trejo, A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, *141*(3), 695-703.

Sánchez-Martínez, C., & Pérez-Martín, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*—similar inputs, different outputs. *Current opinion in microbiology*, *4*(2), 214-221.

Sakin, V., Richter, S. M., Hsiao, H. H., Urlaub, H., & Melchior, F. 2015. Sumoylation of the GTPase ran by the RanBP2 SUMO E3 ligase complex. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(39), 23589-23602.

Schwienhorst, I., Johnson, E. S., & Dohmen, R. J. (2000). SUMO conjugation and deconjugation. *Molecular and General Genetics MGG*, 263(5), 771-786.

Steinberg, G., & Perez-Martin, J. 2008. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology*, 18(2), 61-67.

Strunnikov, A. V., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics*, 158(1), 95-107.

Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh-e, A., Yasuda, H., & Kikuchi, Y. 2001. Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 48973-48977.

Takizawa, P. A., DeRisi, J. L., Wilhelm, J. E., & Vale, R. D. (2000). Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*, 290(5490), 341-344.

Teixeira, M.C. Monteiro, P.T. Palma, M. Costa, C. Godinho, C.P. Pais, P. Cavalheiro, M. Antunes, M. Lemos, A. Pedreira, T. Sá-Correia I. (2018) YEASTRACT, an upgraded database for the analysis of transcription regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae* *Nucl. Acids Res.*, 46 (Issue D1): D348-D353, Oxford University Press.

Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., & Holloman, W. K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and cellular biology*, 8(9), 3703-3709.

Valverde, M. E., Paredes-López, O., Pataky, J. K., Guevara-Lara, F., & Pineda, T. S. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source—biology, composition, and production. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(3), 191-229.

Wang, Q. M., Begerow, D., Groenewald, M., Liu, X. Z., Theelen, B., Bai, F. Y., & Boekhout, T. 2015. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*. *Studies in mycology*, 81, 55-83.

Warena, A. J., & Konopka, J. B. (2002). Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, *13*(8), 2732-2746.

Westfall, P. J., & Momany, M. (2002). *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre-and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Molecular biology of the cell*, *13*(1), 110-118.

Wilkinson, K. a, & Henley, J. M. 2010. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical Journal*, *428*(2), 133–45.

Wong, K. H., Todd, R. B., Oakley, B. R., Oakley, C. E., Hynes, M. J., & Davis, M. A. 2008. Sumoylation in *Aspergillus nidulans*: sumO inactivation, overexpression and live-cell imaging. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(5), 728-737.

Xhemalce, B., Seeler, J.-S., Thon, G., Dejean, A., & Arcangioli, B. 2004. Role of the fission yeast SUMO E3 ligase Pli1p in centromere and telomere maintenance. *The EMBO Journal*, *23*(19), 3844–53.

Yeh, E. T. (2009). SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(13), 8223-8227.

Yoo, C. Y., Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Park, H. C., Salt, D. E., ... & Hasegawa, P. M. (2006). SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in *Arabidopsis* independent of salicylic acid. *Plant Physiology*, *142*(4), 1548-1558.

You, B. J., Lee, M. H., & Chung, K. R. (2009). Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. *Archives of microbiology*, *191*(7), 615-622.

Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, *41*(11), 973-981.

Yunus, A. A., & Lima, C. D. 2009. Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Molecular cell*, 35(5), 669-682.

Zhao, X., & Blobel, G. 2005. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), 4777-4782.

Zhou, W., Ryan, J. J., & Zhou, H. 2004. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32262–8.

XIII. RESUMEN BIOGRÁFICO

Ana Luisa Rios Holguín

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ESTUDIO DEL MECANISMOS DE SUMOILACIÓN EN *Ustilago maydis*

Campo de estudio: Genómica funcional

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el día 6 de Octubre de 1995

Educación: Egresado de la carrera de Licenciado en Biotecnología Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Junio de 2016.

Experiencia profesional: Docente de la materia de bioinformática en el periodo escolar Agosto – Diciembre 2017, y de la materia de genómica funcional en el periodo Enero – Junio 2018 en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

XIV. SUPLEMENTARIOS

Tabla 18. Mediciones de absorbancia de la cinética de crecimiento en MM pH4

TIEMPOS	ABSORBANCIA			
	FB1	FB2	S1	S2
0	0.072	0.16	0.073	0.088
	0.076	0.166	0.077	0.087
	0.074	0.169	0.085	0.089
8	0.443	0.796	0.442	0.478
	0.472	0.795	0.435	0.488
	0.492	0.815	0.44	0.515
12	0.968	1.255	0.826	0.916
	0.94	1.201	0.851	0.921
	0.93	1.201	0.842	0.913
24	1.735	1.988	1.596	1.688
	1.745	1.991	1.518	1.664
	1.738	1.992	1.554	1.661
36	2	2.133	1.841	1.943
	1.976	2.132	1.814	1.923
	1.982	2.128	1.823	1.914
48	2.104	2.074	1.955	2.113
	2.101	2.06	1.961	2.098
	2.089	2.076	1.957	2.107

Tabla 19. Mediciones de absorbancia de la cinética de proteína en MM pH4

PROTEÍNA				
TIEMPOS	FB1	FB2	S1	S2
0	0.154	0.298	0.134	0.152
	0.15	0.299	0.133	0.15
	0.156	0.302	0.152	0.146
8	0.223	0.553	0.295	0.241
	0.234	0.566	0.307	0.269
	0.237	0.568	0.313	0.27
12	0.285	0.677	0.391	0.424
	0.314	0.762	0.409	0.453
	0.311	0.759	0.416	0.455
24	0.331	0.307	0.234	0.21
	0.332	0.31	0.237	0.211
	0.336	0.311	0.241	0.212
36	0.289	0.376	0.195	0.264
	0.289	0.374	0.197	0.263
	0.286	0.385	0.197	0.276
48	0.416	0.418	0.247	0.292
	0.427	0.421	0.25	0.294
	0.426	0.421	0.252	0.295

Tabla 20. Mediciones de absorbancia de la cinética de crecimiento en MM pH7

ABSORBANCIA				
TIEMPOS	FB1	FB2	S1	S2
0	0.07	0.165	0.096	0.094
	0.069	0.171	0.099	0.098
	0.077	0.179	0.103	0.098
8	0.389	0.779	0.452	0.526
	0.418	0.835	0.536	0.538
	0.413	0.813	0.408	0.54
12	0.891	1.23	0.948	1.012
	0.907	1.253	0.954	1.001
	0.877	1.233	0.958	0.951
24	1.682	2.02	1.679	1.808
	1.682	2.018	1.735	1.793
	1.695	2.017	1.695	1.783
36	1.953	2.212	1.991	2.089
	1.95	2.213	1.993	2.083
	1.958	2.198	1.989	2.092
48	2.112	2.186	2.14	2.21
	2.092	2.195	2.174	2.209
	2.089	2.199	2.145	2.204

Tabla 21. Mediciones de absorbancia de la cinética de proteína en MM pH7

PROTEÍNA				
TIEMPOS	FB1	FB2	S1	S2
0	0.153	0.173	0.167	0.127
	0.151	0.173	0.169	0.126
	0.147	0.205	0.191	0.158
8	0.273	0.355	0.166	0.278
	0.281	0.402	0.186	0.286
	0.284	0.405	0.188	0.294
12	0.334	0.604	0.486	0.461
	0.345	0.602	0.485	0.462
	0.347	0.616	0.481	0.471
24	0.227	0.401	0.23	0.302
	0.228	0.404	0.238	0.31
	0.229	0.409	0.24	0.312
36	0.198	0.388	0.27	0.248
	0.201	0.388	0.271	0.254
	0.202	0.397	0.273	0.252
48	0.391	0.313	0.35	0.303
	0.39	0.316	0.352	0.305
	0.391	0.325	0.35	0.308

Tabla 22. Mediciones de absorbancia de la cinética de crecimiento en MM pH9

ABSORBANCIA				
TIEMPOS	FB1	FB2	S1	S2
0	0.03	0.004	0.046	0.017
	0.024	0.006	0.047	0.019
	0.035	0.01	0.053	0.023
8	0.128	0.104	0.142	0.176
	0.14	0.112	0.151	0.198
	0.138	0.12	0.155	0.2
12	0.223	0.225	0.25	0.376
	0.245	0.266	0.271	0.407
	0.245	0.244	0.266	0.403
24	1.279	1.247	1.225	1.544
	1.232	1.276	1.248	1.579
	1.336	1.294	1.236	1.583
36	1.719	1.655	1.581	1.862
	1.727	1.664	1.591	1.865
	1.729	1.664	1.618	1.839
48	2.002	2.015	1.89	2.143
	2.001	2.01	1.912	2.12
	2.003	2.012	1.913	2.122

Tabla 23. Mediciones de absorbancia de la cinética de proteína en MM pH9

PROTEÍNA				
TIEMPOS	FB1	FB2	S1	S2
0	0.149	0.126	0.163	0.121
	0.149	0.125	0.161	0.121
	0.143	0.120	0.159	0.117
8	0.116	0.155	0.158	0.213
	0.115	0.157	0.167	0.217
	0.116	0.158	0.168	0.217
12	0.197	0.191	0.208	0.282
	0.196	0.189	0.212	0.287
	0.197	0.187	0.216	0.287
24	0.24	0.179	0.16	0.242
	0.246	0.182	0.169	0.248
	0.248	0.185	0.171	0.25
36	0.3	0.252	0.262	0.281
	0.306	0.254	0.261	0.283
	0.305	0.259	0.265	0.284
48	0.422	0.373	0.323	0.325
	0.426	0.379	0.322	0.331
	0.428	0.379	0.327	0.332