



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“Análisis *In silico* e interrupción del gen no codificante *ter84* y estudio de *ter63*:
Efectos sobre el potencial replicativo y la longitud del telómero de *Ustilago
maydis*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCION EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

Juan Antonio Sanpedro Luna

ASESORA DE TESIS:

D.C. Patricia Sánchez Alonso

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2017



BUAP

Puebla, Pue. a 26 de enero 2017.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Juan Antonio Sanpedro Luna**, es informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis In silico e interrupción del gen no codificante ter84 y estudio de ter63: Efecto sobre el potencial replicativo y la longitud del telómero de Ustilago maydis”

A nuestro juicio, el alumno **Juan Antonio Sanpedro Luna** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Lucía López Reyes

D.C. Candelario Vázquez Cruz

D.C. Norma Elena Rojas Ruíz

M.C. Alejandra Espinosa Texis

Índice General

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
RNAs largos no codificantes (lncRNAs).....	3
Clasificación y función de los lncRNAs.....	4
Telómeros	6
Telomerasa.....	8
La subunidad catalítica (TERT).....	9
La subunidad TER	10
<i>Ustilago maydis</i>	11
El ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	12
<i>U. maydis</i> como modelo biológico	13
ANTECEDENTES	14
JUSTIFICACIÓN.....	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Cepas y medios de cultivo	18
Plásmidos	18
Diseño de oligonucleótidos.....	19
Reacción en cadena de la polimerasa	19
Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos de ADN	20
Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	20
Ligación del fragmento en el vector de clonación	21
Preparación de células competentes.....	21
Transformación de células competentes	21
Extracción de ADN plasmídico	22
Extracción de ADN Total	22

Purificación y cuantificación de ADN.....	23
Transformación de <i>Ustilago maydis</i>	23
Análisis de la morfología colonial y celular	24
Cinética de crecimiento	24
Análisis del fragmento terminal de restricción	25
Ensayos de infección en planta.....	25
Análisis <i>In silico</i> de loci análogos	26
RESULTADOS	27
Clonación y purificación del casete de interrupción para <i>ter84</i>	27
Transformación de protoplastos de <i>U. maydis</i>	28
Análisis de la integración del casete de interrupción en las transformantes.....	28
Análisis de la morfología colonial y celular	31
Cinética de crecimiento	32
Análisis del fragmento terminal de restricción	34
Ensayos de infección en plantas de maíz.....	36
Análisis <i>In silico</i> de loci análogos	37
Construcción del casete de interrupción para <i>ter63</i>	41
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	49
PERSPECTIVAS	50
ANEXOS	51
REFERENCIAS	54

Índice de Figuras

Figura 1. Localización genómica de los diferentes tipos de lncRNAs.....	5
Figura 2. Funciones moleculares de los lncRNAs.....	6
Figura 3. Organización estructural de la subunidad TERT	10
Figura 4. Esquema representativo de la estructura secundaria de la subunidad de RNA de la telomerasa de eucariotas superiores	11
Figura 5. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	12
Figura 6. Perfil de restricción del plásmido pCASA1 y purificación del fragmento conteniendo el casete de interrupción.....	27
Figura 7. Verificación de la delección del dominio templete de <i>ter84</i>	28
Figura 8. Verificación de la presencia del casete de interrupción insertado en el sitio correcto del genoma de <i>U. maydis</i>	28
Figura 9. Verificación del remplazo de locus e inserción del gen <i>hph</i>	30
Figura 10. Fenotipo de las cepas silvestres de <i>U. maydis</i> y transformantes interrumpidas sobre medio YEPS	31
Figura 11. Morfología colonial y celular de las cepas silvestres de <i>U. maydis</i> y transformantes interrumpidas	31
Figura 12. Cinética de crecimiento de las cepas silvestres y mutantes <i>ter84::hph</i>	33
Figura 13. Correlación entre el recuento de células totales y el número de UFC	34
Figura 14. Análisis del fragmento terminal de restricción (TRF) de las cepas silvestres y mutantes <i>ter84::hph</i>	35
Figura 15. Desarrollo de la infección en plantas de maíz.....	37
Figura 16. Alineamientos múltiples de las regiones intergénicas	40
Figura 17. Linearización del vector de clonación y amplificación de las regiones flanqueantes de <i>ter63</i>	41
Figura 18. Perfil de restricción de los plásmidos pTer63-5' y pTer63-3'	41
Figura 19. Digestión de la construcción pTer63-3'	42
Figura 20. Subclonación del extremo 5' en pTer63-3'.....	42
Figura 21. Perfil de restricción de la construcción pTer63-Sub5'	42

Figura 22. Purificación de la construcción pTer63-Sub5' linearizada y de la banda del gen <i>hph</i>	43
Figura 23. Digestión del ADN plasmídico de las transformantes recuperadas	43
Figura A1. Localización genómica de la secuencia intergénica <i>ter84</i> y secuencias flanqueantes amplificadas para recombinación	52
Figura A2. Localización genómica de la secuencia intergénica <i>ter63</i> y secuencias flanqueantes amplificadas para recombinación	52
Figura A3. Diagrama de los plásmidos pTer63-5' y pTer63-3'	53
Figura A4. Subclonación del fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I-5' en el vector pTer63-3'	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas utilizadas	18
Tabla 2. Plásmidos utilizados	18
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados	19
Tabla 4. Tiempo de generación de las cepas silvestres y mutantes <i>ter84::hph</i>	34
Tabla 5. Cruzas de cepas de <i>U. maydis</i> en plántulas de maíz y porcentajes de infección....	36
Tabla 6. Desarrollo de la infección con cepas silvestres y mutantes <i>ter84⁻</i> de <i>U. maydis</i> ..	36
Tabla 7. Resumen de los alineamientos de los loci análogos con la secuencia <i>ter84</i> embebida en diversas especies de <i>Ustilago</i>	38
Tabla 8. Resumen de los alineamientos de los loci análogos con la secuencia <i>ter63</i> embebida en diversas especies de <i>Ustilago</i>	39
Tabla A1. Densidad óptica a 600nm de los cultivos de las cepas silvestres y mutantes <i>ter84::hph</i>	51
Tabla A2. Recuento celular de los cultivos de las cepas silvestres y mutantes <i>ter84::hph</i> .	51
Tabla A3. Conteo de UFC de los cultivos de las cepas silvestres y mutantes <i>ter84::hph</i>	51

Lista de Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cbp	Cantidad bastante para
CH ₃ CO ₂ K	Acetato de potasio
CTE	Extensión carboxilo terminal
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-infección
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Guanina
g	Gramo
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
kb	Kilobases
l	Litro
LB	Luria Bertani
LiCl	Cloruro de litio
lncRNA	RNA largo no codificante
M	Molar
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio

ml	Mililitro
mM	Milimolar
MnCl ₂	Cloruro de manganeso
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
ncRNA	RNA no codificante
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
ORF	Marco de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
RbCl	Cloruro de rubidio
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Dominio transcriptasa reversa
SCS	Sorbitol-Citrato de sodio
SDS	Dodecilsulfato sódico
STC	Sorbitol-CaCl ₂ -Tris-HCl
T.E.	Tris-EDTA
TAS	Secuencias asociadas a telómeros
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
TEN	Dominio N-terminal esencial de la telomerasa
TER	ARN de la telomerasa
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa
TRBD	Dominio de unión a ARN de la telomerasa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volteos

RESUMEN

Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) son una clase importante de transcritos que están implicados en una amplia variedad de funciones biológicas, los cuales son capaces de reconocer secuencias complementarias, así como de plegarse en estructuras secundarias termodinámicamente estables, que pueden servir como señales, guías, señuelos y sitios de andamiaje para proteínas involucradas en diversos procesos funcionales y regulatorios en la célula, lo que permite regular el silenciamiento transcripcional, remodelamiento de la cromatina, tráfico nuclear y citoplasmático, splicing y traducción. Por otra parte, la telomerasa es un complejo enzimático ribonucleoproteico que cataliza la síntesis del repetido telomérico, permitiendo mantener la integridad de los telómeros en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas, evitando que estos sean reconocidos como rupturas de doble cadena, previniendo de esta forma la fusión de los extremos y eventos de degradación y recombinación, promovidos por la maquinaria de reparación del ADN celular. Los componentes centrales de esta enzima son una subunidad catalítica con actividad de transcriptasa reversa (TERT) y un componente de RNA (TER) el cual funciona tanto como plataforma para el montaje de las subunidades proteicas, así como templete para la transcripción reversa. La subunidad TERT posee cuatro dominios conservados denominados TEN, TRBD, RT y CTE, los cuales son fundamentales para la función y el reclutamiento de la enzima al telómero; el componente de RNA muestra una variabilidad en la longitud y composición de la secuencia nucleotídica, no obstante posee una estructura central secundaria que en general se encuentra conservada, la cual contiene motivos para la unión con la subunidad catalítica, además de secuencias y elementos fundamentales implicados en la maduración y estabilidad de la enzima, esta estructura se encuentra conformada por el dominio templete, el elemento 5' colindante al templete (TBE) y el dominio pseudonudo. Previamente se ha reportado que el hongo dimórfico *Ustilago maydis*, contiene una unidad de repetición de telómeros idéntica a la repetición de mamíferos y un conjunto de proteínas asociadas a telómeros que presentan homología a las de otros eucariotas modelo, además de una serie de características que lo hacen un excelente modelo para el estudio de procesos genéticos.

Por otra parte Sánchez-Alonso y colaboradores (2014) lograron la identificación e interrupción del gen *trt1* que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa en *U. maydis*, además de la caracterización de las mutantes correspondientes y la identificación de tres regiones intergénicas capaces de transcribirse denominadas *ter9*, *ter63* y *ter84*, que exhiben características estructurales similares a las reportadas para el componente de RNA de la telomerasa, con la presencia de la secuencia molde (CCCUAA) en una región de cadena sencilla y la ubicación río abajo de una secuencia que potencialmente podría formar la estructura de pseudonudo. Por tanto, en este trabajo se realizó la obtención de mutantes *ter84* con un casete de interrupción previamente elaborado por Calderón-Salais (2014), además de la caracterización fenotípica y el análisis del fragmento terminal de restricción de dichas mutantes, en conjunto con el análisis de los loci análogos localizados en los genomas de diferentes hongos filogenéticamente relacionados. El análisis experimental demostró que la secuencia intergénica *ter84* es dispensable para el mantenimiento de la homeostasis de los telómeros, así como para la replicación y conclusión del ciclo de vida del hongo; mientras el análisis *In silico* indicó que entre organismos del mismo género existen regiones con una organización espacial conservada que contienen loci análogos a las regiones donde se localizan las secuencias de *ter84* y *ter63* en *U. maydis*.

INTRODUCCIÓN

RNAs largos no codificantes (lncRNAs)

El mejoramiento en las tecnologías de secuenciación ha permitido el desarrollo de nuevos enfoques para el análisis global de transcriptomas, lo que ha revelado que las regiones transcritas del genoma son mucho más abundantes que lo anticipado; sin embargo, solamente una pequeña fracción de los transcritos es traducida, y el resto de los transcritos sin el potencial para codificar proteínas referidos como RNAs no codificantes (ncRNAs) se encuentran ampliamente presentes en una gran diversidad de especies de plantas, hongos, mamíferos e invertebrados, participando en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, se estima que alrededor del 80% del genoma humano es transcrito, pero solamente menos del 2% codifica para proteínas, también se ha demostrado que aproximadamente un 74.5% de secuencias únicas del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* son transcritas (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Birney *et al.*, 2007). Se desconoce la función de una vasta mayoría de estos transcritos, sin embargo, se ha observado que existe una correlación directa entre la abundancia de ncRNAs y la complejidad del organismo, así como también que su regulación se encuentra relacionada con el desarrollo de enfermedades (Taft *et al.*, 2007; Mattick, 2011). Dentro de los ncRNAs se encuentran presentes los RNAs largos no codificantes (lncRNAs), los cuales poseen una longitud de más de 200 nucleótidos y participan en una amplia variedad de funciones biológicas a través de la regulación de la expresión genética en diferentes niveles, incluyendo remodelamiento de la cromatina, regulación transcripcional y procesamiento post-transcripcional (Wilusz *et al.*, 2009). La participación de los lncRNAs en diversos procesos se debe en gran medida a su capacidad de plegarse en estructuras secundarias termodinámicamente estables, lo que resulta en la formación de dominios reconocibles tales como dobles hélices, horquillas y pseudonudos; a causa de que el ARN tiene la capacidad de formar enlaces de tipo Watson-Crick, así como enlaces tipo Hoogsten, cuyas interacciones colectivas contribuyen a la formación de dominios modulares plegables impactando en la funcionalidad de los lncRNAs (Mercer y Mattick, 2013). Aunque los lncRNAs muestran una amplia funcionalidad se ha demostrado que en muchos casos su expresión se encuentra restringida a determinados contextos de desarrollo, exhibiendo determinados patrones de expresión que dependen del tipo de tejido celular, y una

localización subcelular específica. Este último caso fue observado en líneas celulares humanas donde aproximadamente el 33% de lncRNAs se encontraron exclusivamente en el núcleo, 15% en el citoplasma y cerca de un 45% en ambos sitios (Kapranov *et al.*, 2007).

Clasificación y función de los lncRNAs

De acuerdo a su localización dentro del genoma y dirección de transcripción en relación a otros genes (Figura 1) los lncRNAs pueden ser clasificados como: 1) sentido, 2) antisentido, en el primer caso los lncRNAs son transcritos a partir de la cadena sentido de un gen codificante, pudiendo superponerse en una parte o en la secuencia entera de dicho gen, en cambio los transcritos antisentido son aquellos que se transcriben a partir de la cadena complementaria de genes que codifican proteínas, frecuentemente regulando la expresión del transcrito complementario a través de diversos mecanismos; 3) bidireccionales, son aquellos donde la transcripción se inicia cerca y en dirección opuesta al sitio de inicio de la transcripción de un gen codificante, mostrando patrones de expresión similares, sugiriendo que ambas secuencias podrían compartir procesos regulatorios; 4) intrónicos cuando se localizan dentro de un intron de un transcrito codificante, los cuales comúnmente participan en la estabilización del primer transcrito o en la regulación de su splicing alternativo; 5) intergénicos cuando se localizan interpuestos entre regiones codificantes, estando al menos a 1 kb de distancia del gen codificante más cercano (Ponting *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013; Mattick y Rinn, 2015). En base a su mecanismo molecular de acción los lncRNAs pueden funcionar como señales, guías, señuelos o sitios de andamiaje (Figura 2), en el primer caso actúan como marcadores de eventos biológicos significantes en un determinado contexto celular o en respuesta a diversos estímulos, desempeñando su función regulatoria rápidamente al no requerir del proceso de traducción. Como guías dirigen la correcta localización de complejos de proteínas a blancos específicos ya sea en *cis* (genes adyacentes) o en *trans* (genes distantes) para controlar la expresión del gen diana. Los lncRNAs que actúan como señuelo se unen a factores de transcripción y a complejos remodeladores de la cromatina, actuando como reguladores negativos e impidiendo su acceso a la cromatina.

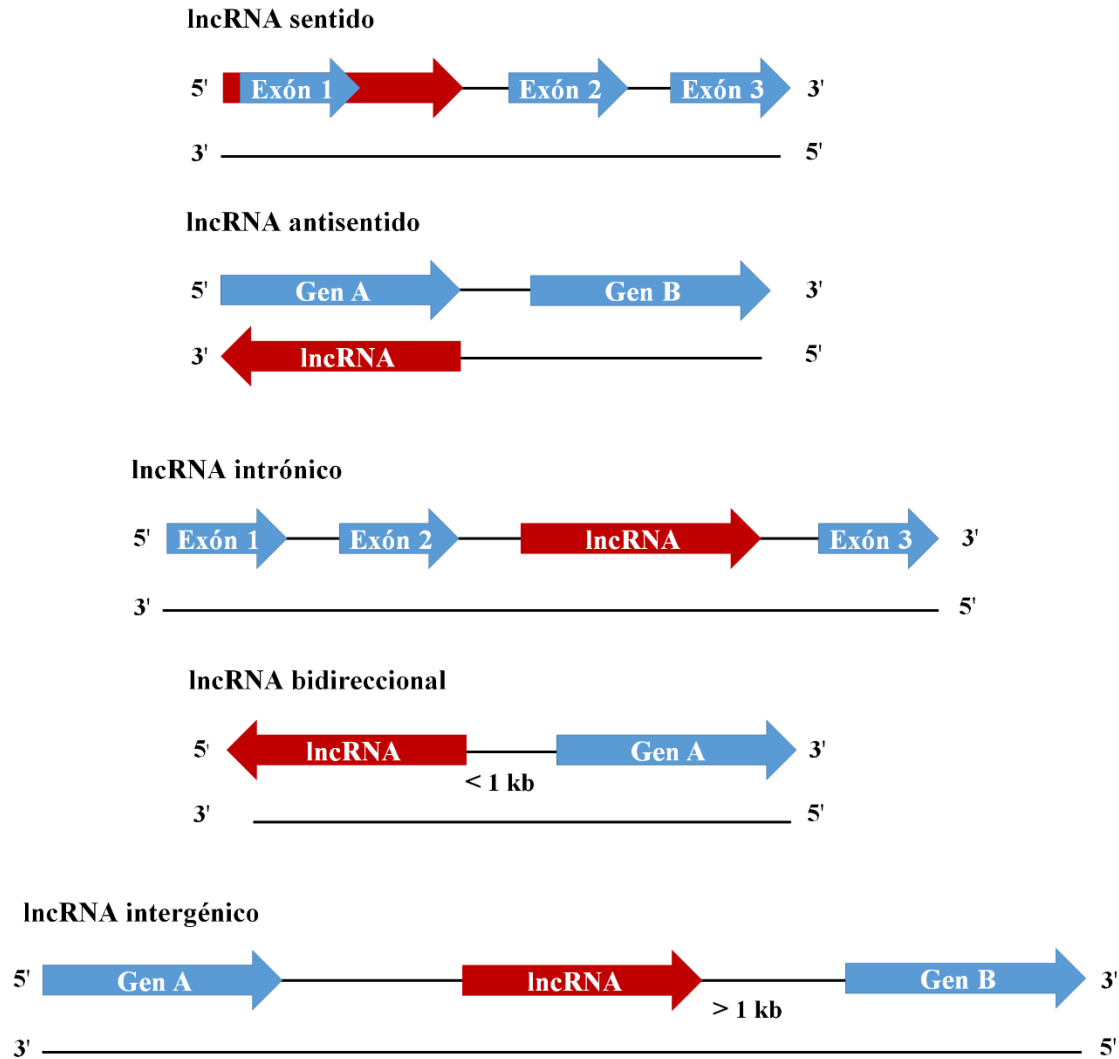


Figura 1. Localización genómica de los diferentes tipos de lncRNAs.
(Modificado de Ma *et al.*, 2013).

Finalmente, como sitios de andamiaje los lncRNAs sirven como plataformas centrales sobre las cuales los componentes moleculares de un determinado complejo se ensamblan mediante el acoplamiento con los dominios de unión (Wang y Chang, 2011), un ejemplo es la subunidad de ARN (TER) de la telomerasa, un complejo enzimático ribonucleoprotéico que cataliza la síntesis del repetido telomérico, permitiendo mantener la integridad de los telómeros. Donde TER funciona tanto como plataforma para el montaje de las subunidades proteicas, así como templete para la transcripción reversa.

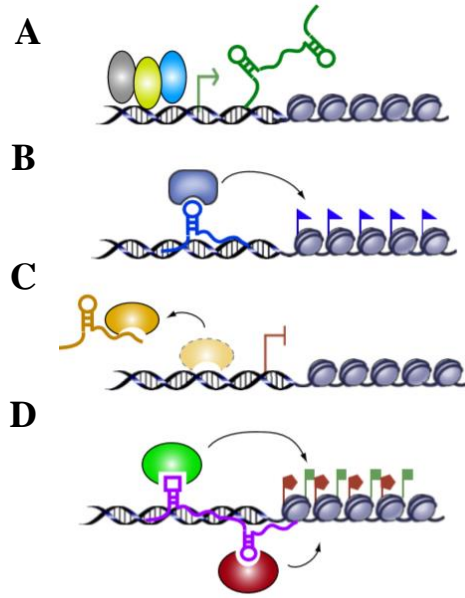


Figura 2. Funciones moleculares de los lncRNAs (A) Señales. (B) Guías. (C) Señuelos. (D) Sitios de andamiaje (Wang y Chang, 2011).

Telómeros

Los telómeros son complejos nucleoprotéicos localizados en los extremos de los cromosomas lineales, que se encargan de protegerlos evitando que sean reconocidos por la maquinaria de reparación del ADN celular como rupturas de doble cadena, previniendo de esta forma la fusión de los extremos y eventos de degradación y recombinación (Amiard *et al.*, 2013; Wai, 2004). El ADN telomérico está constituido por secuencias cortas arregladas en tándem, que varía en su composición de nucleótidos y longitud dependiendo del organismo (Kuprys *et al.*, 2013), estas secuencias se encuentran orientadas en sentido 5' a 3' hacia la parte terminal del cromosoma y finalizan en un extremo 3' monocatenario rico en G. Este colgante de cadena sencilla invade la cadena doble del ADN telomérico para formar media estructura de Holliday denominada asa-T, ocultando de esta forma los extremos, previniendo la activación de puntos de control de daño en el ADN (Griffith *et al.*, 1999). Asociadas al ADN telomérico se encuentran unidas una serie de proteínas que forman un complejo denominado complejo shelterin o telosoma en eucariotas superiores y levaduras respectivamente. Estas proteínas se encargan de proporcionar estabilidad y protección a los telómeros, y algunas de ellas participan activamente en su replicación y cohesión durante las distintas fases del ciclo celular.

Por lo que la pérdida de función de alguno de sus componentes conduce a la activación de los mecanismos de respuestas al daño de ADN, la detención del ciclo celular y la inestabilidad cromosómica (Diotti y Loayza, 2011). En mamíferos el complejo shelterin está constituido por seis proteínas: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y Rap1 (Palm y Lange, 2008); mientras que en *S. cerevisiae* el telosoma se encuentra formado por las proteínas Rap1p, Rif1p, Rif2p, Sir2p, Sir3p y Sir4p. (Bourns *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 1994). Por otra parte, las regiones subteloméricas de los cromosomas usualmente contienen secuencias moderadamente repetitivas denominadas secuencias asociadas a telómeros (TAS), que se encuentran compuestas por secuencias no codificantes repetidas en tándem que en algunos casos contienen motivos teloméricos intercalados; las TAS muestran una distribución polimórfica en el genoma con una amplia variación en número de copias y organización incluso entre cepas (Louis *et al.*, 1994). Debido a que las regiones subteloméricas son sitios altamente dinámicos y están sujetos a eventos de recombinación éstas desempeñan un papel importante en la estabilidad genómica y la adaptación (Horowitz *et al.*, 1994; Louis y Haber 1990). En *S. cerevisiae* se han descrito dos clases de secuencias asociadas a telómeros denominados elemento X y elemento Y'. El elemento Y' es altamente conservado y presenta dos tamaños, Y' largo (6.7 kb) y Y' corto (5.2 kb) que se diferencian entre sí por múltiples inserciones/deleciones pequeñas, encontrándose de 0 a 4 copias arregladas en tándem adyacentes al repetido telomérico. El elemento X es menos conservado y presenta una longitud que va desde 0.3 kb a 3 kb, hallándose en todos los telómeros, este elemento puede encontrarse contiguo al repetido telomérico o al elemento Y', cuando los telómeros contienen ambos elementos el elemento Y' se localiza más cerca al extremo cromosomal y pequeños tramos de ADN telomérico son encontrados entre estos elementos (Zakian, 1996; Wellinger y Zakian, 2012). De igual forma en *S. cerevisiae* se ha descrito que la pérdida de la actividad de la telomerasa resulta en un acortamiento progresivo de los telómeros, conduciendo a eventos de senescencia replicativa. Sin embargo, un pequeño porcentaje de la población celular conocida como supervivientes utilizan mecanismos basados en recombinación para el alargamiento y mantenimiento del ADN telomérico, de acuerdo a su patrón de amplificación y requerimientos genéticos se distinguen dos tipos de supervivientes: Tipo I las cuales muestran múltiples copias del elemento Y' en los extremos cromosomales y dependen de Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 y Rad57; y Tipo II las cuales muestran largo

tramos heterogéneos del repetido telomérico y requieren de la función de Rad52, del complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), Sgs1 y Rad59, pero no de Rad51 (Revisado en Lue y Yu, 2016).

Telomerasa

Las secuencias teloméricas se acortan progresivamente durante cada ciclo de división celular, a causa del llamado “problema de la replicación terminal”, debido a que la ADN polimerasa solo puede llevar a cabo la replicación del ADN en sentido 5' a 3', por lo que durante la síntesis de la cadena discontinua al momento de retirar el cebador más distal éste no puede ser remplazado, resultando en un extremo 3' monocatenario y provocando el acortamiento de las secuencias terminales en cada replicación (Wai, 2004), mientras la replicación en la cadena líder como es de esperar produce extremos romos, que posteriormente son procesados para generar extremos 3' monocatenarios en ambos extremos del cromosoma (Makarov *et al.*, 1997). Para compensar la pérdida de ADN que resulta de la replicación incompleta, se requiere sintetizar nuevas repeticiones teloméricas, siendo el mecanismo predominante el que implica la actividad de la telomerasa la cual es una ribonucleoproteína con acción transcriptasa reversa que se componen de una subunidad catalítica, TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) y una molécula de ARN denominada TER (Telomerase RNA) que contiene la secuencia molde para la síntesis de nuevas repeticiones teloméricas (Kuprys *et al.*, 2013). La subunidad TERT cataliza la transcripción reversa al utilizar como iniciador el extremo 3' monocatenario y a la subunidad TER como molde; posteriormente la ADN polimerasa sintetiza una cadena complementaria y genera así una molécula de doble hebra, finalmente TERT se disocian del ADN recientemente sintetizado y se reubican cerca del iniciador para un nuevo ciclo de elongación. En organismos unicelulares y células proliferativas de metazoarios, la telomerasa se expresa constitutivamente, en ausencia de la telomerasa algunas células emplean una vía de replicación del ADN, basada en recombinación conocida como alargamiento alternativo de los telómeros, en contraste las células somáticas carecen de la actividad de la enzima, mostrando un acortamiento paulatino de los telómeros conforme la edad avanza, conduciendo a la senescencia celular (Giardini, 2014).

La subunidad catalítica (TERT)

Mediante análisis de secuencias se ha determinado que la subunidad catalítica de la telomerasa posee cuatro dominios estructurales conservados (Figura 3), incluso entre organismos filogenéticamente distantes, donde el dominio catalítico contiene secuencias características de transcriptasas reversas de retrovirus y retrotransposones (Lingner *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997), y al igual que otras polimerasas posee una estructura tridimensional en forma de una mano derecha con los “dedos”, “palma” y “pulgar” formando dominios (Autexier y Lue, 2006). Estos dominios son: TEN (Telomerase Essential N-terminal domain), TRBD (Telomerase RNA Binding Domain), RT (Reverse Transcriptase domain) y el dominio CTE (C-Terminal Extension). El dominio TEN contiene un sitio de anclaje que ayuda a estabilizar la unión del ADN telomérico monocatenario dentro del complejo, mientras la subunidad TER se realinea para el siguiente ciclo de transcripción, contribuyendo a la procesividad de la enzima (Steczkiewicz, *et al.*, 2011). TRBD contiene motivos involucrados en el reconocimiento y unión con la subunidad de TER, requiriéndose esta interacción para el adecuado ensamble y actividad enzimática (Rouda y Skordalakes, 2007). El dominio RT se encuentra compuesto de motivos característicos de transcriptasas reversas (1, 2, A, B', C, D y E), difiriendo de las RT convencionales debido a la inserción de una secuencia de tamaño considerable entre los motivos A y B' conocida como IFD (insertion in finger domain) (Brault *et al.*, 2008). A su vez el dominio RT está organizado en dos subdominios que forman la estructura de "palma" y "dedos", donde el primero contiene la región de agarre del cebador y el sitio catalítico de la enzima, mientras el segundo participa en la unión de nucleótidos y procesividad (Mitchell *et al.*, 2010). El dominio CTE que estructuralmente corresponde al “pulgar”, posee un bajo grado de homología de secuencias de aminoácidos y está implicado en la procesividad y localización intracelular de la telomerasa, así como en funciones especie-específicas, siendo dispensable en algunos organismos y estando completamente ausente en otros. (Autexier y Lue, 2006; Huard *et al.*, 2003).

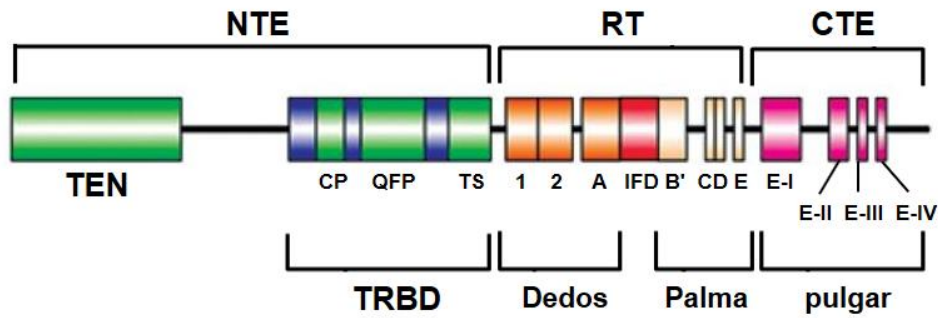


Figura 3. Organización estructural de la subunidad TERT (Wyatt *et al.*, 2010).

La subunidad TER

La subunidad de ARN además de proporcionar la secuencia molde para la transcripción reversa ayuda a ensamblar el complejo ribonucleoproteico, pero en contraste con la subunidad catalítica, tiene una amplia divergencia, debido a que presenta poca similitud de secuencias y variaciones en su longitud, que va desde los 148-209 nt en ciliados a ~450 nt en vertebrados, 1.3 kb en levaduras (*S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*), hasta 2.2 kb en *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei* (Chen y Greider, 2000; Theimer y Feigon, 2006), sugiriéndose que esta variabilidad de tamaños podría ser resultado de la adquisición o pérdida de una variedad de dominios estructurales especie-específicos en diferentes grupos taxonómicos. Sin embargo, posee una estructura central secundaria que en general se encuentra conservada en eucariontes, la cual contiene motivos para la unión con la subunidad TERT, así como secuencias y elementos fundamentales para la función de la enzima (Figura 4) (Blackburn, 2005). Esta estructura central presenta tres dominios estructurales conservados que son: el dominio molde, el dominio pseudonucleo y el elemento 5' colindante al template (TBE, template boundary element), además de contener sitios de unión para proteínas responsables de la maduración y la estabilidad de la subunidad TER (Chappell y Lundblad, 2004). El dominio molde se localiza en una región de cadena sencilla y por lo general tiene una longitud de aproximadamente una y media copias de la repetición telomérica, aunque puede ser más largo o más corto y su límite se encuentra definido por la estructura secundaria de TER (Zvereva *et al.*, 2010).

En este dominio el extremo 5' contiene la secuencia nucleotídica complementaria a la cadena rica en G del ADN telomérico mientras que el extremo 3' se utiliza típicamente para la alineación del cebador (Blackburn y Collins, 2011). El elemento 5' colindante al templete se localiza río arriba del dominio molde y funciona como sitio de unión para la subunidad catalítica, además de proporcionar una barrera física mediante la formación de una estructura de hélice, que es importante ya que define el límite del templete donde termina la transcripción inversa (Tzfati y Chen, 2012). Finalmente, el dominio pseudonudo participa en la unión con la subunidad catalítica y procesividad de la enzima. Este dominio se localiza inmediatamente adyacente al dominio molde y forma una estructura de triple hélice, cuya estabilidad se relaciona directamente con la actividad de la telomerasa (Theimer *et al.*, 2005).

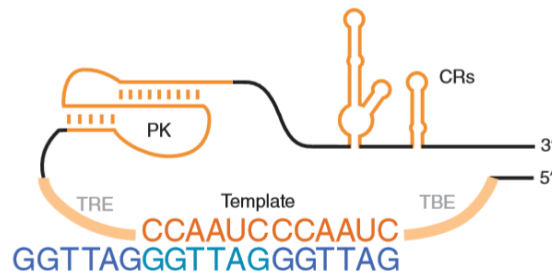


Figura 4. Esquema representativo de la estructura secundaria de la subunidad de RNA de la telomerasa de eucariotas superiores. (Template) Dominio molde. (TRE) Elemento de reconocimiento del molde. (TBE) Elemento 5' colindante al templete. (PK) Dominio pseudonudo. (CRs) Regiones conservadas (Yang y Lee, 2015).

Ustilago maydis

Ustilago maydis es un hongo dimórfico, fitopatógeno, que pertenece al orden de los Ustilaginales, el cual parasita plantas de maíz (*Zea mays* L.) y de teocintle (*Zea mays* spp. *parviglumis*) provocando la enfermedad conocida como carbón del maíz, que se caracteriza principalmente por la formación de tumores en los tejidos de la planta hospedera (Ruiz-Herrera y León-Ramírez, 2012). En su fase haploide crece en forma de células levaduriformes saprófitas que se reproducen por gemación y presenta un tamaño de 12-18 μm de longitud y 4-5 μm de ancho, (Holliday, 1995). Mientras la fase diploide ocurre cuando dos células haploides (esporidios) sexualmente compatibles se unen ocasionando que el hongo se transforme en patogénico y parasito obligado (Banuett, 1995).

El ciclo de vida de *U. maydis*

La transición de la fase haploide a la fase diploide es regulada por un sistema de apareamiento tetrapolar formado por los loci de apareamiento *a* y *b*, esta transición comienza con el reconocimiento entre las células haploides compatibles por medio de una cascada de señalización conformada por las rutas AMPc y MAPK (Bölker, 2001). El locus bialélico *a* (*a1* y *a2*) controla el reconocimiento y la fusión celular, y codifica para los componentes del sistema de apareamiento que consta de los precursores (Mfa1 y Mfa2) y de los receptores (Pra1 y Pra2) de feromonas lipopeptídicas (Banuett, 1995). El reconocimiento sucede cuando la feromona de un tipo de apareamiento es reconocida por el receptor del otro tipo de apareamiento, una vez que ocurre el reconocimiento se produce la plasmogamia y se forma el micelio dicariótico infectivo, esta formación es controlada por el locus multialélico *b* que codifica para las proteínas bE y bW, las cuales contienen un dominio central en donde se produce la dimerización entre los productos de los genes de diferentes alelos para producir un heterodímero que actúa como factor de transcripción el cual controla la morfogénesis y patogénesis (Yee y Kronstad, 1998). El micelio continúa su crecimiento y forma una estructura especializada llamada apresorio, por medio del cual penetra al tejido vegetal, se produce el crecimiento invasivo del micelio en la planta y la formación de tumores donde las hifas del hongo proliferan.

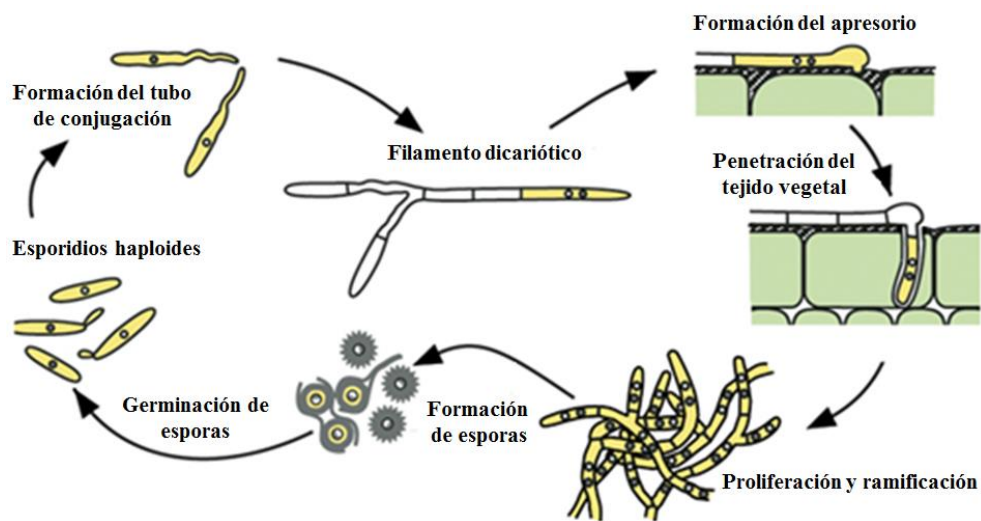


Figura 5. Ciclo de vida de *U. maydis*. (Kämper *et al.*, 2006).

Posteriormente ocurre la cariogamia y la fragmentación de las hifas para dar lugar a la formación de esporas diploides o teliosporas, que eventualmente son liberadas al medio ambiente y germinan produciendo el promicelio, en donde ocurre la meiosis para forman cuatro basidiosporas que al germinar reinician el ciclo de vida del hongo (Figura 5) (Pérez-Martín *et al.*, 2006).

***U. maydis* como modelo biológico**

U. maydis representa un excelente modelo para el estudio de procesos genéticos, debido a que es fácilmente cultivable y sensible para su manipulación molecular. Se han desarrollado marcadores de selección, genes de escrutinio, así como promotores constitutivos e inducibles para *U. maydis* (Wang *et al.*, 1988; Gold *et al.*, 1994; Brachmann *et al.*, 2004). Las células haploides pueden ser eficientemente transformadas mediante recombinación homóloga permitiendo la introducción o delección de genes (Fotheringham y Holloman, 1989). Su ciclo de vida puede ser completado de 2-3 semanas en condiciones controladas de invernadero y es posible realizar análisis de segregación genética (Banuett, 1995). La regulación de la transición dimórfica entre la fase haploide y la fase patógena mediada por un locus de control único, permite la construcción de cepas haploides patógenas que se pueden utilizar para identificar los genes implicados en la virulencia (Bölker, 2001). El genoma de *U. maydis* ha sido secuenciado y anotado, revelando que posee un genoma relativamente pequeño (20.5 Mb) en comparación con otros hongos patógenos de plantas y que contiene 6,902 genes modelo, con un bajo número de intrones (Kämper *et al.*, 2006). Además, se ha determinado que *U. maydis* comparte un mayor número de proteínas y procesos celulares con *Homo sapiens* en comparación a *S. cerevisiae* (Münsterkötter y Steinberg, 2007), así como también un conjunto de proteínas asociadas a telómeros con homología a las de otros eucariotas modelo (Sánchez-Alonso y Guzmán, 2008) y una unidad de repetición de telómeros idéntica a la encontrada en telómeros de humanos y otros vertebrados (Guzmán y Sánchez, 1994).

ANTECEDENTES

Como parte del estudio y análisis estructural de los extremos cromosomales de *Ustilago maydis*, se determinó que sus telómeros poseen una longitud aproximadamente de 240 pb y se encuentran compuestos por al menos 37 repeticiones en tándem de la secuencia nucleotídica TTAGGG (Guzmán y Sánchez, 1994), también se identificaron dos clases de secuencias asociadas a telómeros (TAS) denominadas *UTASa* y *UTASb*, mientras la primera presenta una secuencia altamente conservada, se localiza principalmente en los extremos cromosomales y contiene un marco de lectura abierto con homología a helicasas RecQ; *UTASb* tiene una secuencia menos conservada y presenta una distribución variable, ya sea adyacente al repetido telomérico o a *UTASa* (Sánchez-Alonso y Guzmán, 1998).

Mutantes telomerasa negativas fueron generadas mediante la interrupción del gen *trt1* que codifica para la subunidad TERT de *U. maydis* (locus um11198), en las cuales se observó un lento crecimiento, bajo potencial replicativo, el acortamiento gradual de los telómeros, y la incapacidad para la formación de teliosporas, así como también la aparición de células supervivientes deficientes de telomerasa, obtenidas después de 256 generaciones que mostraron alteraciones en el fragmento terminal de restricción (Bautista-España *et al.*, 2014).

López-Lara (no publicado) identificó transcritos de tres regiones intergénicas denominadas *ter9*, *ter63* y *ter84* que presentan una longitud y estructura secundaria similar a la subunidad TER de vertebrados, con la presencia de una y media copias de la secuencia molde (CCC_nUAA) en una región de cadena sencilla y la ubicación río abajo de una secuencia con plegamiento similar al dominio pseudonudo, indicando que alguna de estas secuencias podría corresponder al gen que codifica para la subunidad TER de *U. maydis*. Posteriormente Calderón-Salais (2014), realizó el ensamblaje de un casete de interrupción para *ter84* mediante la delección de la región central y la incorporación del gen *hph* como marcador de selección, con el objetivo de generar las mutantes correspondientes y esclarecer la función de este gen.

JUSTIFICACIÓN

La identificación de genes funcionales que se encuentran conservados en humanos y *U. maydis* sugiere que ambos organismos comparten una parte de los procesos celulares y en consecuencia una maquinaria molecular semejante. La caracterización parcial de los genes putativos de lncRNA *ter84* y *ter63* anteriormente identificados indica que poseen: (a) capacidad de transcribirse en el sentido adecuado, (b) el tamaño y estructura secundaria de los transcritos es similar al de la subunidad TER de vertebrados, (c) su localización celular es preferentemente nuclear, (d) los genes se localizan en regiones intergénicas. Actualmente se desconoce la función de estos genes putativos por lo cual su caracterización podría ayudar a mejorar el entendimiento de su posible papel en los procesos moleculares involucrados en el metabolismo o mantenimiento de los telómeros del hongo. Por lo cual en este trabajo se propone utilizar el casete de interrupción previamente elaborado para *ter84*, para obtener las mutantes interrumpidas de este gen de ncRNA y determinar si contribuye al mantenimiento de los telómeros. Adicionalmente se hará el análisis *In silico* de la secuencia *ter63* con el mismo fin.

HIPÓTESIS

La interrupción de al menos uno de los genes no codificantes *ter63* o *ter84* de *U. maydis* podría afectar la longitud del telómero y el potencial replicativo del hongo.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Analizar si los genes *ter63* y *ter84* de *U. maydis* contribuyen al mantenimiento de la longitud de los telómeros.

Objetivos particulares

- Obtener transformantes interrumpidas de *U. maydis* con un casete convencional de interrupción en un paso para *ter84* de las cepas complementarias 521 (*a1b1*) y 518 (*a2b2*) de *U. maydis*.
- Analizar la topología de secuencias similares en loci análogos del genoma de diferentes hongos del mismo género.
- Caracterizar las transformantes en su morfología colonial y celular, su velocidad de crecimiento, patrón de TRF, y potencial patogénico en plántulas de maíz.
- Realizar la construcción del casete de interrupción para *ter63*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* y *U. maydis* utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. El cultivo de *E. coli* se realizó a 37°C durante 18 horas en medio LB (peptona de caseína 10 g/l, NaCl 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) cuando fue necesario. Las cepas de *U. maydis* se crecieron a 28°C durante 24 horas en medio YEPS (sacarosa 20 g/l, peptona de caseína 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l).

Tabla 1. Cepas utilizadas.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>U. maydis</i> 521	<i>a1b1</i>	W.K. Holloman
<i>U. maydis</i> 518	<i>a2b2</i>	W.K. Holloman
<i>U. maydis</i> Ter84-02	<i>a2b2, ter84::hph</i>	Este trabajo
<i>U. maydis</i> Ter84-07	<i>a2b2, ter84::hph</i>	Este trabajo
<i>U. maydis</i> Ter84-12	<i>a1b1, ter84::hph</i>	Este trabajo
<i>U. maydis</i> Ter84-15	<i>a1b1, ter84::hph</i>	Este trabajo

Plásmidos

Para la construcción del casete de interrupción para *ter63* se utilizaron los plásmidos mostrados en la Tabla 2, empleando a *E. coli* DH5α como cepa receptora.

Tabla 2. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Descripción	Tamaño	Referencia
pBluescript KS (-)	<i>Amp^r, lacZα</i>	2,958 pb	Stratagene
pTer63-5'	Plásmido derivado de pBluescript KS- que contiene la secuencia flanqueante 5' de <i>ter63</i>	4,116 pb	Este trabajo
pTer63-3'	Plásmido derivado de pBluescript KS- que contiene la secuencia flanqueante 3' de <i>ter63</i>	3,988 pb	Este trabajo
pTer63-Sub5'	Plásmido derivado de pBluescript KS- que contiene las secuencias flanqueantes 5' y 3' de <i>ter63</i>	5,087 pb	Este trabajo
pCM1007	Plásmido que contiene el gen <i>hph</i> unido a ambos lados con las secuencias flanqueantes 5' y 3' de <i>trt1</i>	6,670 pb	W.K. Holloman
pCM54	Plásmido de replicación autónoma que confiere resistencia a higromicina	5,100 pb	W.K. Holloman

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la confirmación de la delección de *ter84* y amplificación de las regiones flanqueantes de *ter63* (Tabla 3) fueron diseñados utilizando el programa PrimerSelect (DNASTAR, Inc.), a partir la secuencia del genoma de *U. maydis* disponible en Genbank.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia	Fragmento amplificado	Tamaño del amplificado	Referencia
SecTer63-5'Upp	TTGCGGCCGCTGCGCTCAACATCGTAGGTCA	Secuencia flanqueante 5' de <i>ter63</i>	1,158 pb	Sánchez Alonso, no publicado
Sec63-5' BamHI Low	ATGGATCCGATTCGGTTTTGGCTTTTTGTTCA			Este trabajo
Sec63-3' BamHI Upp	GCGGATCCAAGCCGTACCTCTATTCGTGATTG	Secuencia flanqueante 3' de <i>ter63</i>	1,030 pb	Sánchez Alonso, no publicado
SecTer63-5'Lower	GGGCGGCCGCGTCTTTGTCCGGTGTGCTGTGCG			Este trabajo
Ter84-5'Upp	CAAAACAGTGCCGAATGAGGATG	Extremo 5' de <i>ter84</i>	1,211 pb	Este trabajo
Ter84-5'Low	GTGAAGCGTGAAGCGTGGACAGT			Este trabajo
Ter84-Hyg5'Upp	TTAGCGCAAATGAACAAGAGG	Secuencia flanqueante 5' de <i>ter84</i> y extremo 5' de <i>hph</i>	1,837 pb	Este trabajo
Ter84-Hyg5'Low	GATGCTTTGGGCCGAGGACTGC			Este trabajo
Ter84-Hyg3'Upp	CAATAGGAAGGCGGCGGAATCAGT	Secuencia flanqueante 3' de <i>ter84</i> y extremo 3' de <i>hph</i>	1,557 pb	Este trabajo
Ter84-Hyg3'Low	AAGCGCGTTGTTTTGGTTTCGTT			Este trabajo
Ter84Upper	CTGGAGGCGGGCTTCT			Sánchez Alonso, no publicado

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Invitrogen)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un Termociclador T100 (Bio-Rad), utilizando reacciones con un volumen final de 50 μ l, con una composición como la que se muestra a continuación: buffer para PCR 10X 5 μ l, MgCl₂ 50 mM 1.5 μ l, mix dNTP's 10 mM 1 μ l, oligonucleótido delantero 0.4 μ l (100 mM), oligonucleótido reverso 0.4 μ l (100 mM), Platinum *Taq* DNA Polymerase Invitrogen 0.4 μ l (5 U/ μ l), ADN genómico 100 ng.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial un ciclo a 94°C durante 2 minutos; desnaturalización (94°C durante 30 segundos), alineamiento (30 segundos) y extensión (72°C) 30 ciclos; extensión final un ciclo a 72°C durante 5 minutos. La temperatura de alineamiento y el tiempo de extensión se ajustó de acuerdo al par de oligonucleótidos utilizados y al tamaño del amplificado respectivamente.

Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos de ADN (Tautz y Renz, 1983)

Los productos de PCR y de restricciones enzimáticas fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 0.5X (Tris Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) a 100V durante 30 minutos, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas). La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz UV. El fragmento correspondiente al tamaño esperado, se escindió del gel y se trituró con ayuda de un cubreobjetos, se agregó un volumen de fenol-T.E., se colocó a -70°C hasta la congelación. Se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico, se homogenizó totalmente durante 30 segundos y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se adicionó un volumen de cloroformo, se mezcló nuevamente y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos. A la fase superior recolectada se le agregó 0.5 volúmenes de acetato de amonio (7.5 M, pH 5.5) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 1 hora. Por último, se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 20 µl de agua destilada estéril. La purificación de los fragmentos fue verificada mediante electroforesis utilizando las mismas condiciones anteriores.

Digestión de ADN con enzimas de restricción (Invitrogen)

Las reacciones de restricción se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en resumen, en un tubo eppendorf se agregó 3 µl del buffer de reacción 10X, ADN problema 3 µl (1-2 µg/µl), enzima 1 µl (10 U/µl), agua destilada estéril cbp 30 µl. Las reacciones se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

Ligación del fragmento en el vector de clonación (Thermo Scientific)

Las reacciones de ligación para la integración de fragmentos de ADN en el vector de clonación se llevaron a cabo utilizando la enzima T4 DNA Ligase, de acuerdo a las siguientes condiciones: en un tubo eppendorf se colocó 100 ng de vector, 300 ng de inserto, 2 μ l de buffer de reacción 10X, 1 μ l de T4 DNA Ligase (5 U/ μ l), agua destilada estéril cbp 20 μ l. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 12 horas.

Preparación de células competentes (Berger y Kimmel, 1987)

A partir de un cultivo de *E. coli* en placa se preparó un precultivo, tomando una colonia e inoculando 5 ml de medio LB que se incubó a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se inocularon 250 ml de medio LB con 2.5 ml del precultivo y se dejó en incubación a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600}=0.5$ (Aproximadamente 3 horas). El paquete celular fue recolectado por medio de centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 12.5 ml de solución reguladora I (RbCl 100 mM, MnCl₂ 45 mM, CH₃CO₂K 88 mM, CaCl₂ 10 mM, LiCl 0.5 mM, glicerol 15%, pH=5.8), se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregó 2 ml de solución reguladora II (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM, glicerol 15%, pH=7.0), se agito suavemente hasta disolver el paquete celular y se colocaron alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Transformación de células competentes (Berger y Kimmel, 1987)

En 200 μ l de células competentes se agregó 5 μ l del producto de ligación se mezcló suavemente y se colocó sobre hielo durante 30 minutos, inmediatamente después se colocó a 37°C durante 10 minutos, a continuación, se agregó 1 ml de medio LB para dejarlo en incubación a 37°C durante 1 hora. Finalmente se sembró por extensión 100 μ l de la suspensión de células en placas de medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml).

Extracción de ADN plasmídico (Sambrook *et al.*, 1989)

A partir de un cultivo de 5 ml incubado durante 18 horas a 37°C se recolectó el paquete celular por centrifugación a 11,000 rpm por 10 minutos, se removió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µl de Solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0), posteriormente se agregó 200 µl de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se agregó 150 µl de la Solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial 11.5 ml, H₂O 28.5 ml), nuevamente se mezcló por inversión y se centrifugó a 11,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (fenol saturado en T.E. pH 8.2, en relación 25:24:1), se agitó fuertemente hasta homogenizar la emulsión para después centrifugarla a 11,000 rpm durante 5 minutos, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 11,000 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, nuevamente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y por último se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente para resuspenderlo en 50 µl de agua destilada estéril.

Extracción de ADN Total (Modificado de Sherman *et al.*, 1986)

La obtención de ADN genómico de *U. maydis* se realizó a partir de cultivos incubados durante 18 horas de los cuales se recolectó el paquete celular mediante centrifugación a 3,500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se congeló colocándolo en refrigeración a -70°C durante 20 minutos. A continuación, el paquete celular se trituró con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, el producto pulverizado se transfirió a tubos de polipropileno y se resuspendió en 2 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%). Posteriormente se agregó 2 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó hasta homogenizar completamente y se centrifugó durante 15 minutos a 3,500 rpm. La fase superior se recuperó y se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó durante 10 minutos a 3,500 rpm. Después el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos y el precipitado se lavó dos veces con

etanol al 70%, nuevamente se centrifugó y se retiró el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril.

Purificación y cuantificación de ADN (Sambrook *et al.*, 1989)

A cada muestra de ADN se le agregó 5 µl de RNase A (Thermo Scientific), se mezcló suavemente y se colocó en incubación a 37°C durante 1 hora, a continuación, se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó hasta homogenizar completamente y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la fase superior y se le agregó un volumen de cloroformo, se mezcló fuertemente y se centrifugó a 11,000 rpm por 10 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se le adicionó 0.5 volúmenes de acetato de amonio (7.5 M, pH 5.5) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 11,000 rpm, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. La cuantificación de ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro, registrando la absorbancia a una longitud de onda de 260nm y de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260\text{nm}} \times \text{Factor de dilución} \times 50) / 1000$$

Transformación de *Ustilago maydis* (Fotheringham y Holloman, 1989)

A partir de un cultivo con una D_{0600} de 1.0-1.2 (alrededor de 18 horas de incubación) equivalente a una suspensión de aproximadamente 2.5×10^7 células/ml, se recolectó el paquete celular mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos, se resuspendió suavemente en 5 ml de SCS (sorbitol 1 M, citrato de sodio 50 mM, pH 5.8). Se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos, nuevamente el precipitado se resuspendió en 5 ml de SCS y se centrifugó. A continuación, el paquete celular se resuspendió en 500 µl de SCS, y se adicionó 500 µl de solución de Lyzing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich L1412) preparada al momento disuelta en SCS (50 mg/ml). Se homogenizó suavemente y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Una vez formados los protoplastos se centrifugaron a 1,800 rpm por 5 minutos y el precipitado se lavó dos veces con 3 ml de SCS en cada ocasión.

Posteriormente se agregó 3 ml de STC (sorbitol 1M, CaCl₂ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5), los protoplastos se resuspendieron mezclando suavemente, se centrifugó a 1,800 rpm durante 5 minutos y a continuación el precipitado se resuspendió en 1 ml de STC. Después de esto se distribuyeron alícuotas de 50 µl en tubos de polipropileno a los cuales se les adiciono previamente 2 µl de heparina (15 mg/ml) y 500 ng de ADN linearizado (en un volumen de 1-2 µl). La suspensión se dejó en hielo durante 10 minutos y se agregó lentamente 500 µl de PEG (sorbitol 1 M, Tris-HCl pH 10, CaCl₂ 100 mM, PEG 40%) se mezcló suavemente y nuevamente se dejó sobre hielo por 10 minutos. Se añadió 6 ml de medio TOP (medio completo (Holliday, 1974), sorbitol 1 M, agar 0.8%), se mezcló suavemente por inversión y se vertió sobre placas de regeneración (capa inferior 12.5 ml de medio completo adicionado con higromicina 200 µg/ml, capa superior 12.5 ml de medio completo), para colocarlas en incubación a 28°C durante 5 días.

Análisis de la morfología colonial y celular

Para determinar si la delección de *ter84* producía algún efecto sobre la morfología colonial o celular, se realizaron análisis comparativos de las cepas silvestres y de las mutantes, para lo cual se realizó una observación directa de cultivos crecidos en placas de medio YEPS, y una observación al microscopio utilizando el objetivo 40X a partir de cultivos en medio líquido.

Cinética de crecimiento

A partir de un cultivo en placa, se tomó una colonia y se inocularon 5 ml de medio YEPS, se colocó en incubación a 28°C hasta alcanzar una $DO_{600}=1$, de este precultivo se tomaron 100 µl y se inocularon en 100 ml de medio YEPS contenidos en un matraz de 250 ml. Los cultivos se dejaron en incubación a 28°C con agitación continua a 200 rpm durante 33 horas y se tomó una muestra de 2 ml cada tres horas, para medir la DO_{600} y realizar el conteo de UFC mediante diluciones seriadas y el recuento celular en cámara de Neubauer.

Análisis del fragmento terminal de restricción (Sánchez-Alonso *et al.*, 1996)

5 µg de las muestras de ADN total de *U. maydis* se digirieron con *Pst*I (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, los fragmentos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, como se describe previamente, una vez visualizados los productos, se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N, Invitrogen) para lo cual el gel se dejó sumergido en dos volúmenes de solución de depurinización (HCl 0.25 N) durante 20 minutos con agitación constante. A continuación, el gel se enjuagó con agua destilada estéril y se colocó en dos volúmenes de solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) con agitación continua durante 30 minutos. Nuevamente se realizó un enjuague con agua destilada estéril y por último se colocó en solución de neutralización (Tris-HCl 1M pH 7.4, NaCl 1.5 M) durante 30 minutos con agitación. Para la transferencia por capilaridad el gel se colocó sobre un puente de papel filtro (Whatman 3MM) previamente humedecido en buffer de transferencia SSPE 10X (NaCl 1.5 M, NaH₂PO₄·H₂O 0.1 M, EDTA 0.01 M, pH 7.4) y dispuesto sobre una bandeja, después de esto, una membrana del mismo tamaño del gel se remojó en buffer de transferencia SSPE 10X y se colocó encima del gel seguido de tres hojas de papel filtro igualmente remojadas, asegurándose de que no se formaran burbujas de aire, finalmente se colocó una pila de papel absorbente para dejar llevar a cabo la transferencia durante 12 horas. El ADN se fijó a la membrana mediante exposición a luz UV a 254nm durante 2 minutos. La hibridación se realizó utilizando 0.07 ml/cm² de solución de hibridación (Na₂HPO₄ 0.5 M pH 7.2, SDS 7%, EDTA 1 mM) a 65°C durante 12 horas con 10⁶ cpm/ml de la sonda previamente marcada. Posteriormente la membrana se lavó dos veces con una solución de SSPE 5X y SDS 0.2%, durante 15 minutos a 25°C, seguido de un lavado con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1%, a 25°C durante 10 minutos. Finalmente, el resultado se reveló por autoradiografía.

Ensayos de infección en planta (Puhalla, 1968)

De cultivos frescos en placa se tomó una colonia y se inocularon 5 ml de medio YEPS, se colocó en incubación a 28°C durante 12 horas en agitación constante, a continuación, se tomaron 100 µl del precultivo y se inoculó en 50 ml de medio YEPS se dejó crecer por 18 horas a 28°C y se midió la D₀₆₀₀, los cultivos se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos y el paquete celular se resuspendió en agua destilada estéril para obtener una D₀₆₀₀=10.

Con estas suspensiones se prepararon mezclas (1:1) de las cepas compatibles. La inoculación se realizó en plántulas de maíz (MCS-02) a los 5 días post-emersión, inyectando 100 µl de la suspensión correspondiente. En cada ensayo se utilizaron dos macetas, con ocho plántulas cada una, como control negativo se colocó una maceta con plántulas sin inocular. Las plantas fueron conservadas durante 21 días en condiciones de invernadero y se registraron las observaciones cada dos días.

Análisis *In silico* de loci análogos

Para la identificación de regiones análogas en los genomas disponibles de *Ustilago* spp. en las que se pudieran encontrar embebidas secuencias de lncRNAs similares a *ter84* y *ter63*, como primer paso se utilizó el programa BLAST de la plataforma del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica), para realizar la búsqueda de secuencias homologas al ORF situado en el extremo 5' de la secuencia de lncRNA correspondiente, los contigs con regiones en las que se obtuvieron las mayores puntuaciones fueron enlistados y dentro de sus secuencias se efectuó la búsqueda del ORF situado en el extremo 3' de la región intergénica correspondiente, las secuencias de los contigs en los que se encontraron secuencias homologas a ambos marcos de lectura fueron anotadas, posteriormente se utilizó el programa ApE v2.0.49 para delimitar los ORFs de ambos extremos y establecer la longitud de las regiones intergénicas, considerando la longitud en la anotación del genoma de *U. maydis* para los marcos de lectura señalados. A continuación, se realizaron alineamientos locales con las secuencias de los ORFs y de las regiones intergénicas de *U. maydis* contra los loci candidatos localizados en los genomas de *U. hordei*, *U. esculenta*, *U. cynodontis*, *U. trichophora*, *U. xerochloae* y *U. vetiveriae*. Por último, se realizó la búsqueda de la secuencia del dominio molde en las regiones intergénicas, así como el alineamiento múltiple de estas mismas empleando el programa MegAlign (DNASTAR, Inc.), para la localización de posibles regiones conservadas.

RESULTADOS

Clonación y purificación del casete de interrupción para *ter84*

Para la obtención de transformantes interrumpidas de *U. maydis* se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido portador de casete de interrupción (pCASA1), de las transformantes obtenidas, se eligió una clona y se sembró en LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml), se creció a 37°C durante 18 horas. Posteriormente se llevó a cabo la extracción y purificación del plásmido como se describe en el apartado de materiales y métodos. El ADN plasmídico fue digerido con *Bam*HI para corroborar los componentes de la construcción, obteniendo los fragmentos esperados de 1,083 pb, 2,045 pb y 4,015 pb (Figura 6A) correspondientes al extremo 5', al gen *hph* y al extremo 3' ligado al vector de clonación respectivamente. Una vez verificada la identidad de la construcción, se liberó el casete de interrupción, mediante la digestión con *Hind*III, obteniendo dos bandas de 2,989 pb y 4,156 pb (Figura 6B), esta última correspondiente al casete de interrupción compuesto por el gen *hph* bajo el promotor y terminador HSP70, ligado a los extremos flanqueantes de *ter84* 5' y 3' con una longitud de 1,067 pb y 1,037 pb respectivamente, la cual se escindió del gel y se purificó (Figura 6C).

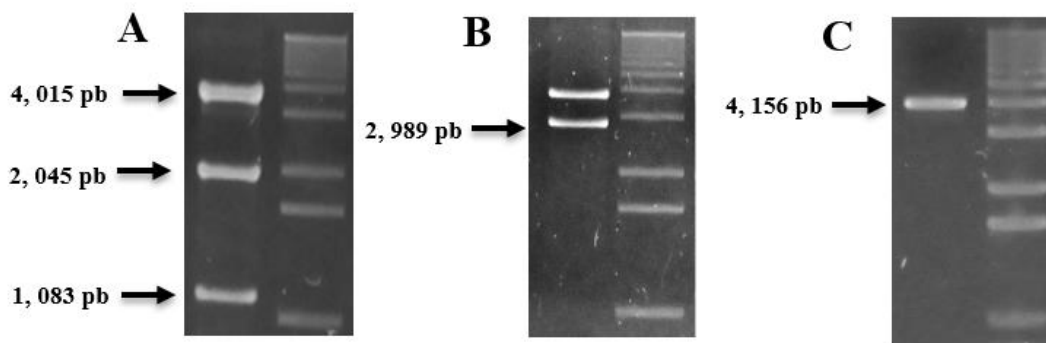


Figura 6. Perfil de restricción del plásmido pCASA1 y purificación del fragmento conteniendo el casete de interrupción.

Transformación de protoplastos de *U. maydis*

Con 500 ng del casete de interrupción en un volumen de 1 μ l se realizó la transformación de protoplastos de *U. maydis*, adicionando el ADN linearizado a una suspensión de 10^6 protoplastos. Como control de la captación de ADN exógeno a una cantidad igual de protoplastos se adicionó 500 ng de ADN plasmídico (pCM54). Los protoplastos se vertieron sobre placas adicionadas con higromicina (200 μ g/ml) y se incubaron a 28°C durante 5 días. Las transformantes que crecieron bajo presión de selección fueron recolectadas y sembradas en placas adicionadas con higromicina. Con la finalidad de descartar eventos episomales, las transformantes fueron sometidas a un pase sin presión de selección y a continuación, sembradas nuevamente bajo presión de selección.

Análisis de la integración del casete de interrupción en las transformantes

El ADN de las transformantes recuperadas se extrajo y se limpió, la integración del casete de interrupción se analizó por medio de ensayos de PCR empleando diversos pares de oligonucleótidos. Como primer paso se buscó determinar si la región eliminada que incluye el dominio templete de *ter84* se encontraba ausente de acuerdo a la estrategia mostrada en la Figura 7A y A1, para lo cual se utilizó el oligonucleótido delantero Ter84-5'Upp que alinea fuera del sitio de recombinación y el oligonucleótido reverso Ter84-5'Low que alinea en una región interna del dominio templete de *ter84*, por tanto, la interrupción de la secuencia diana con la inserción del gen *hph* impide la amplificación de un fragmento de 1,211 pb solamente presente en la cepa silvestre y transformantes ectópicas (Figura 7B, carriles 1,4,8,10,13 y 15). Para corroborar que la falta de amplificación fue a causa de la deleción de la secuencia diana y no de la mezcla de reacción o integridad del ADN, se utilizaron los oligonucleótidos Ter84Upper y Ter84-Hyg3'Low, los cuales alinean dentro y fuera de la secuencia empleada para recombinación respectivamente (Figura 8A), obteniendo amplificadores de 1,810 pb en la cepa silvestre y transformantes ectópicas, y de 3,453 pb en las transformantes interrumpidas (Figura 8B).

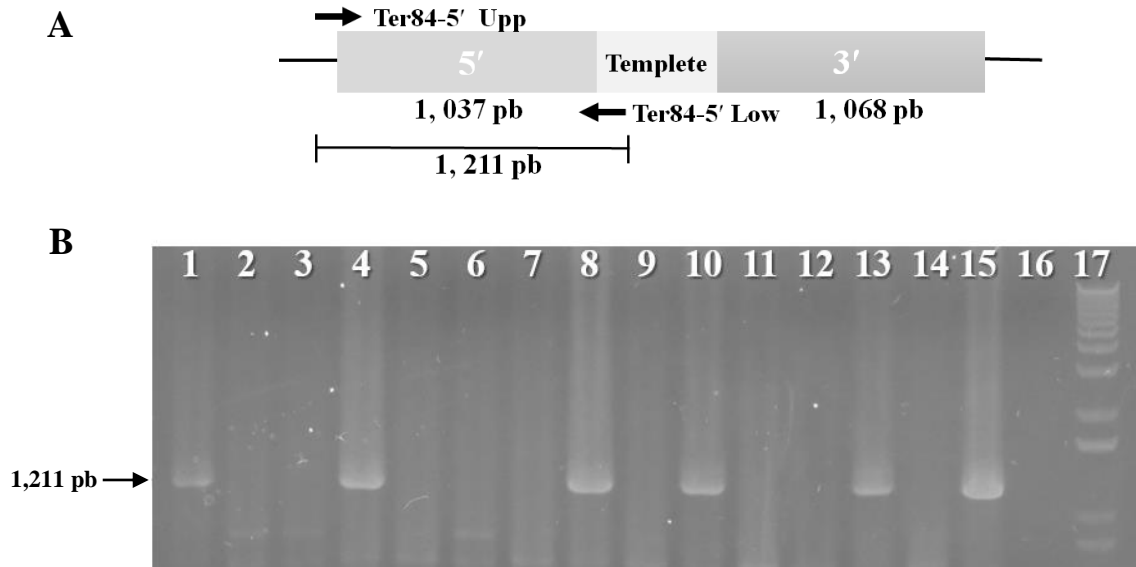


Figura 7. Verificación de la delección del dominio template de *ter84*. (A) Sitios de alineamiento de los oligonucleótidos respecto a las secuencias para recombinación. (B) Electroforesis de los productos de PCR. Transformantes (Carriles 1-14). Cepa silvestre 521 (Carril 15). Control negativo (Carril 16).

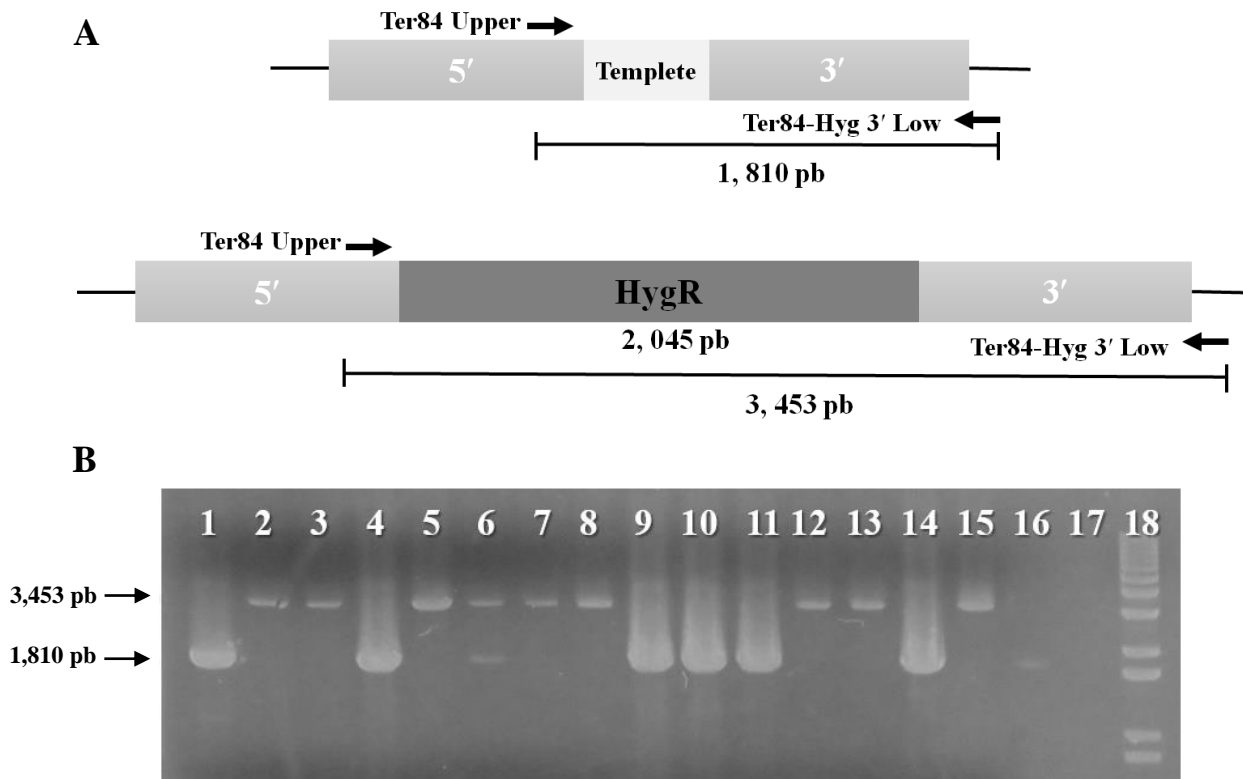
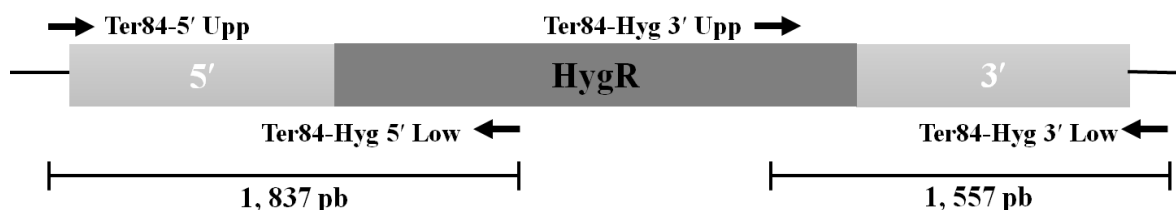


Figura 8. Verificación de la presencia del casete de interrupción insertado en el sitio correcto del genoma de *U. maydis*. (A) Sitios de alineamiento de los oligonucleótidos respecto a las secuencias para recombinación en la cepa silvestre (Diagrama superior) y transformantes interrumpidas (Diagrama inferior). (B) Electroforesis de los productos de PCR. Transformantes (Carriles 1-15). Cepa silvestre 521 (Carril 16). Control negativo (Carril 17).

Se seleccionaron las cepas Ter84-02, Ter84-03, Ter84-05-, Ter84-07, Ter84-08, Ter84-12, Ter84-13 y Ter84-15 en las cuales se obtuvieron amplificadores de 3,453 pb (Figura 8B, carriles 2, 3, 5, 7, 8, 12, 13 y 15 respectivamente) para verificar que dichos amplificadores contenían el marcador de selección. Para lo cual se emplearon juegos de oligonucleótidos que alineaban dentro del gen *hph* y sobre las regiones flanqueantes al sitio de recombinación (Figura 9A). Obteniendo los amplificadores esperados de 1,837 pb para el extremo 5' (Figura 9B, gel superior) y de 1,557 pb para el extremo 3' (Figura 9B, gel inferior), ambos ausentes en la cepa silvestre.

A



B

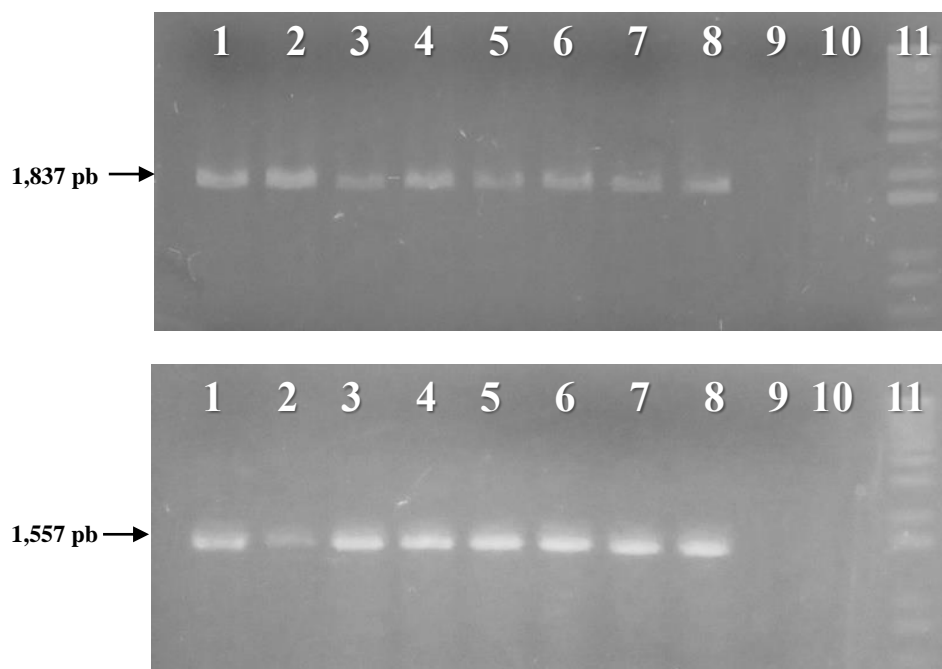


Figura 9. Verificación del remplazo de locus e inserción del gen *hph*. (A) Sitios de alineamiento de los oligonucleótidos respecto a las secuencias para recombinación. (B) Electroforesis de los productos de PCR Transformantes (Carriles 1-8). Cepa silvestre 521 (Carril 9). Control negativo (Carril 10).

Análisis de la morfología colonial y celular

Una vez verificada la inserción de la secuencia de recombinación en el locus correcto, las transformantes fueron resembradas periódicamente sin presión de selección durante varias generaciones, aprovechando que la estabilidad mitótica de una secuencia insertada en el genoma es prácticamente del 100%, contra una estabilidad mitótica inferior al 1% para fragmentos abiertos de DNA (Fotheringham *et al.*, 1989). Las transformantes fueron sembradas nuevamente en medio YEPS adicionado con higromicina junto con las cepas silvestres las cuales fueron incapaces de crecer (Figura 10A). Para determinar si presentaban diferencias al de las cepas silvestres en la morfología macroscópica o celular, se realizaron cultivos tanto en medio liquido como en placas de medio YEPS, en los que no se observaron diferencias macroscópicas (Figuras 10B y 10C), en la morfología colonial (Figura 11A), así como tampoco presentaron diferencias en la morfología celular (Figura 11B) entre las cepas silvestres y las mutantes.

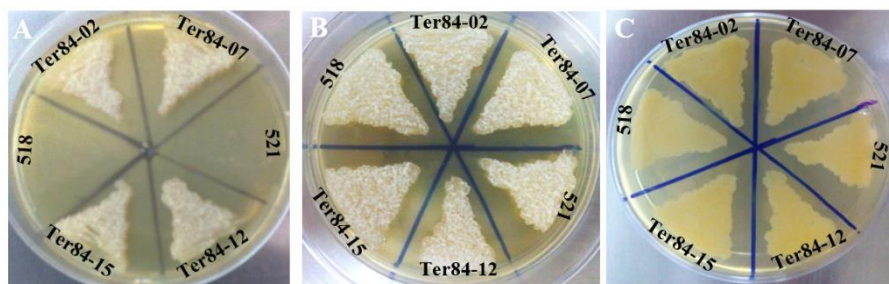


Figura 10. Fenotipo de las cepas silvestres de *U. maydis* y transformantes interrumpidas sobre medio YEPS. (A) Medio adicionado con higromicina. (B) Morfología macroscópica anverso. (C) Morfología macroscópica reverso.

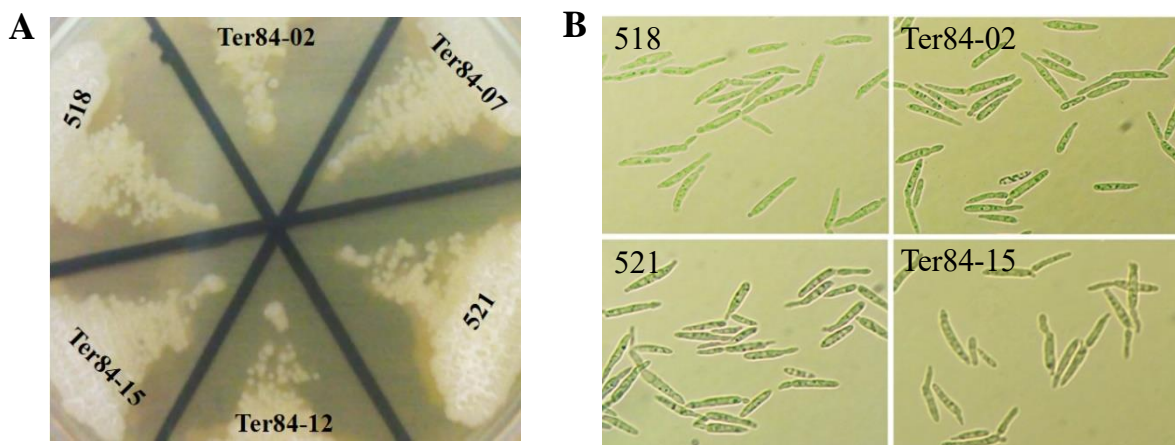


Figura 11. Morfología colonial y celular de las cepas silvestres de *U. maydis* y transformantes interrumpidas.

Cinética de crecimiento

Para determinar si la delección de *ter84* producía algún efecto sobre la velocidad de crecimiento o el potencial replicativo de las mutantes, se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas silvestres y de las mutantes. Tomando una muestra de cada cultivo a partir de las seis horas para determinar DO, UFC y número de células totales (Figura 12). En todos los casos en las gráficas se observa una tendencia similar tanto para las mutantes *ter84::hph* como para las cepas silvestres. Mostrando un crecimiento exponencial a partir de las 6 horas y manteniéndose constante hasta las 24 horas de incubación. El tiempo de generación de cada cepa se calculó con los datos obtenidos de UFC (Tabla A3) y de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Tiempo de generación} = \frac{\ln 2 \times (T2 - T1)}{\ln \frac{X2}{X1}}$$

Donde:

T2 = Tiempo transcurrido al final de la fase exponencial

T1 = Tiempo transcurrido al comienzo de la fase exponencial

X2 = Número de UFC al final de la fase exponencial

X1 = Número de UFC al comienzo de la fase exponencial

Obteniendo un tiempo de generación de aproximadamente 120 minutos para cada cepa (Tabla 4), siendo estos datos congruentes con los reportados previamente para cepas silvestres de *U. maydis* (Snetselaar y McCann, 1997). De igual forma la correlación entre el número de células totales y UFC de todas las cepas no presenta cambios, y el número UFC es proporcional al conteo celular en cámara de Neubauer, mostrando una correlación lineal durante la fase exponencial (Figura 13).

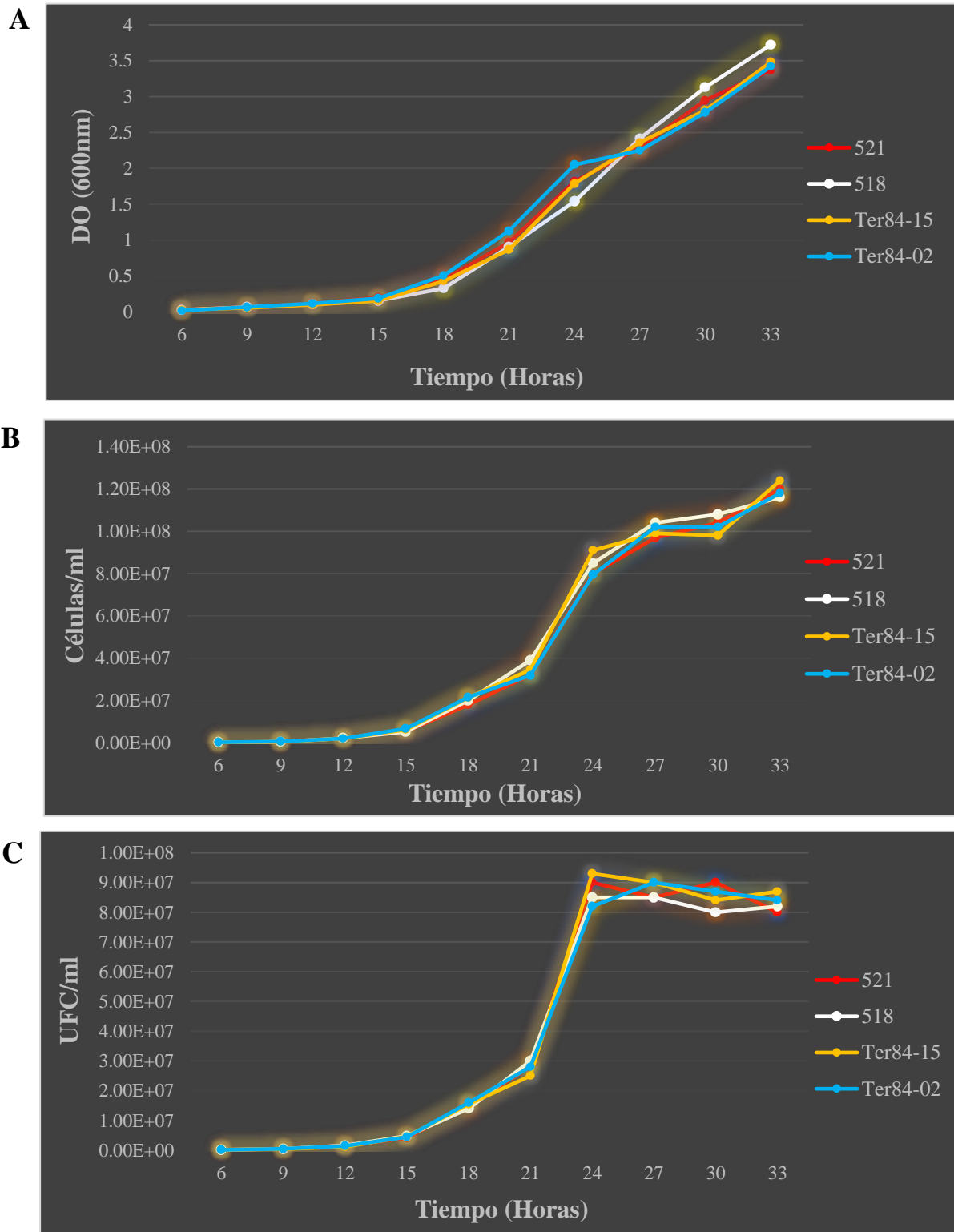


Figura 12. Cinética de crecimiento de las cepas silvestres y mutantes *ter84::hph*. (A) Densidad óptica a 600nm. (B) Recuento celular en cámara de Neubauer. (C) Unidades formadoras de colonias.

Tabla 4. Tiempo de generación de las cepas silvestres y mutantes *ter84::hph*.

Cepa	Tiempo de generación
518	117 min.
Ter84-02	115 min.
521	113 min.
Ter84-15	118 min.

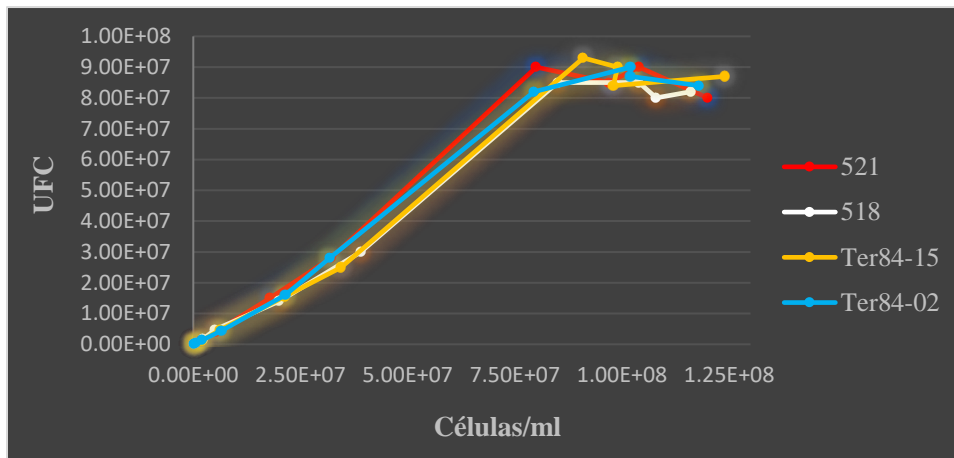


Figura 13. Correlación entre el recuento de células totales y el número de UFC.

De acuerdo al tiempo de generación obtenido y al comportamiento observado en las gráficas, se puede establecer que la delección de *ter84* no tiene efectos adversos sobre la proliferación celular ni disminuye la velocidad de crecimiento.

Análisis del fragmento terminal de restricción

Debido a que mutaciones en los componentes de la telomerasa producen una pérdida progresiva del ADN telomérico y tras varias generaciones se produce la aparición de células sobrevivientes que presentan rearrreglos en las regiones teloméricas y subteloméricas evidenciados por cambios en el patrón de hibridación en el fragmento terminal de restricción, las mutantes *ter84::hph* fueron reseleccionadas constantemente y después de aproximadamente 320 generaciones en el caso de la cepa Ter84-15 y 250 generaciones para las cepas Ter84-02, Ter84-07 y Ter84-12 se realizó la extracción de ADN para ser analizado por Southern blot con la sonda UT1-a marcada con ^{32}P como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Obteniendo el patrón que se muestra en la Figura 14, en el cual se observan cambios sutiles en el patrón de hibridación, principalmente en la región entre 2 kb y 4 kb, que son diferentes a los reportados por Bautista-España y colaboradores (2014) en las cepas *trt1-1* y *trt1-2*. Mientras el análisis de la señal de hibridación muestra que en todos los casos en la región donde se encuentra distribuido la mayor proporción del barrido telomérico (Alrededor de 0.5 kb) se producen un área bajo la curva con una tendencia similar, indicando que la longitud promedio de los telómeros se mantiene dentro del mismo rango en todas las cepas.

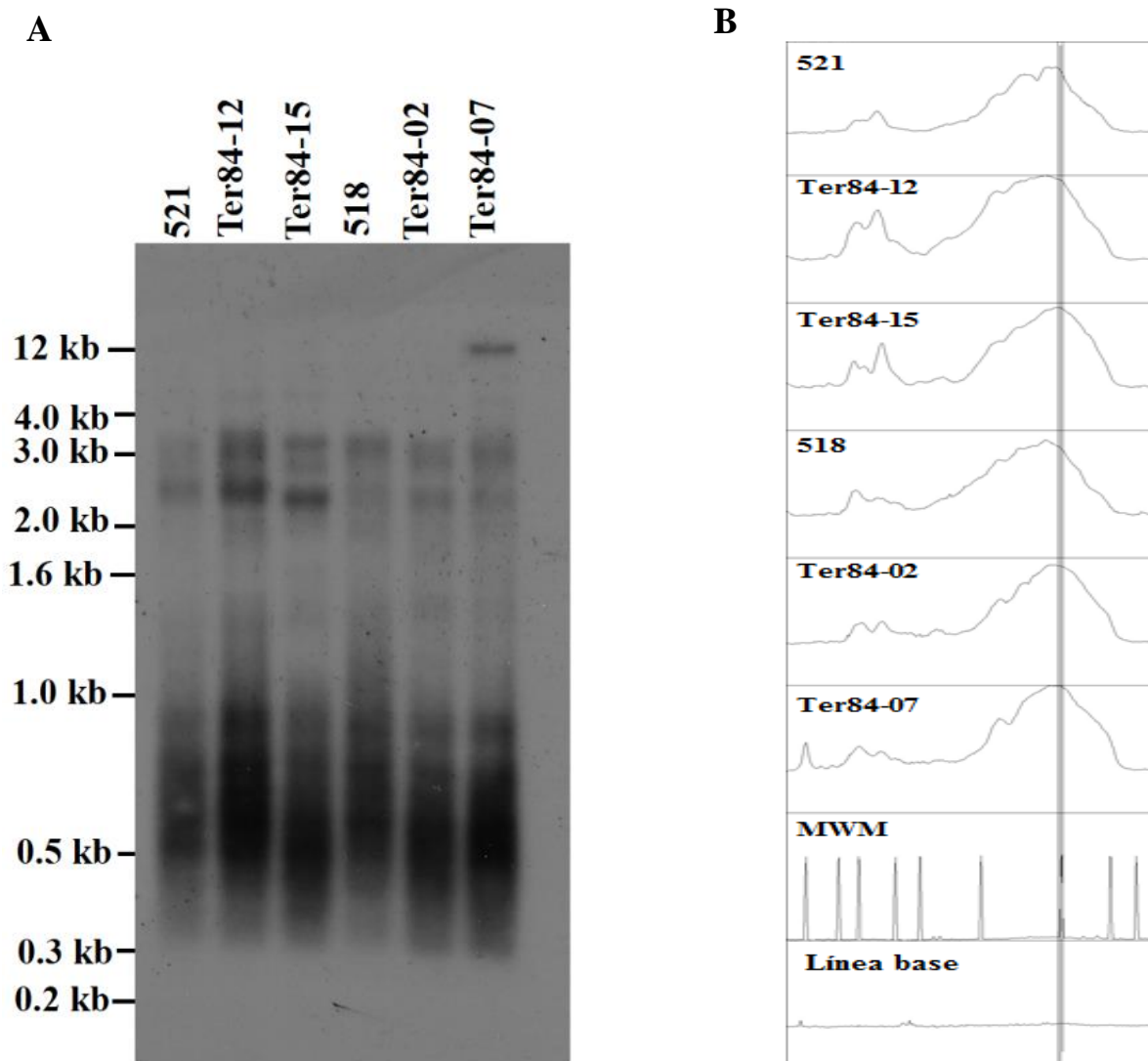


Figura 14. Análisis del fragmento terminal de restricción (TRF) de las cepas silvestres y mutantes *ter84::hph*. (A) Southern blot del TRF. (B) Cuantificación de la señal de hibridación.

Ensayos de infección en plantas de maíz

Para establecer si *ter84* es requerido para el desarrollo patogénico, plántulas de maíz fueron inoculadas con cruzas heterocigotas y homocigotas de mutantes *ter84::hph* (Tabla 5). Las observaciones del desarrollo de la infección se resumen en la Tabla 6, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer que no se presentan cambios en el tiempo de aparición de síntomas de infección entre las plántulas inoculadas con las diversas cruzas, así como tampoco ocurre cambios en el tiempo requerido para la formación de agallas observando aproximadamente un 40% de las plantas con agallas desarrolladas a los 8 dpi en todos los casos.

Tabla 5. Cruzas de cepas de *U. maydis* en plántulas de maíz y porcentajes de infección.

Cruza	Porcentaje de infección
521 X 518	87.5%
Ter84-15 X Ter84-02	88.23%
Ter84-15 X 518	94.11%
521 X Ter84-02	87.50%

En todas las cruzas se desarrollaron agallas maduras donde se observó un porcentaje igual o superior al 50% en todos los casos exceptuando la cruza 521 X Ter84-02 la cual presentó un 37.5% de plantas con agallas maduras, de igual forma esta misma cruza y la cruza Ter84-15 X 518, ambas cruzas heterocigotas presentaron una ligera disminución en la formación de teliosporas con 25% y 29% respectivamente, mientras el control positivo y la cruza homocigota mostraron un porcentaje de alrededor del 35%.

Tabla 6. Desarrollo de la infección con cepas silvestres y mutantes *ter84⁻* de *U. maydis*.

		521 X 518 (n=24)	Ter84-15 X Ter84-02 (n=17)	Ter84-15 X 518 (n=17)	521 X Ter84-02 (n=16)
Aparición de síntomas	4 ± 2 dpi	79.16%	76.47%	88.23%	75.00%
Aparición de agallas	8 ± 2dpi	41.66%	41.17%	47.05%	43.75%
Agallas maduras	12 ± 3 dpi	50.00%	52.94%	58.80%	37.50%
Agallas maduras con teliosporas	17 ± 2 dpi	37.50%	35.29%	29.41%	25.00%



Figura 15. Desarrollo de la infección en plantas de maíz. (A) aparición de síntomas a los 4 dpi. (B) desarrollo de las agallas a los 19 dpi.

Análisis *In silico* de loci análogos

La búsqueda de los marcos de lectura que flanquean a las regiones intergénicas *ter84* y *ter63* (Figura A1 y A2), indica en cada caso que en los genomas de *Ustilago* spp. existen secuencias homologas, las cuales se localizan dispuestas de manera colineal y entre las que se encuentran las respectivas regiones intergénicas con una longitud similar a las de *ter84* y *ter63* (exceptuando *U. hordei* en este último caso).

Tabla 7. Resumen de los alineamientos de los loci análogos con la secuencia *ter84* embebida en diversas especies de *Ustilago*.

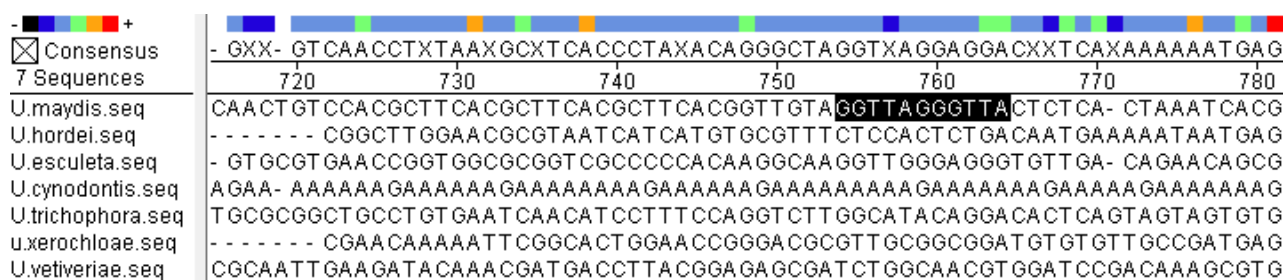
ORF situado en el extremo 5'						
Organismo	Longitud	Cobertura	Identidad	E-value		
<i>Ustilago maydis</i>	1,394 pb	-	-	-		
<i>Ustilago hordei</i>	1,367 pb	21%	94%	5.00E-111		
<i>Ustilago esculenta</i>	1,357 pb	18%	94%	1.00E-112		
<i>Ustilago cynodontis</i>	1,355 pb	21%	95%	4.00E-119		
<i>Ustilago trichophora</i>	1,393 pb	21%	95%	9.00E-121		
<i>Ustilago xerochloae</i>	1,392 pb	21%	94%	2.00E-116		
<i>Ustilago vetiveriae</i>	1,126 pb	21%	96%	4.00E-117		
ORF situado en el extremo 3'						
Organismo	Longitud	Cobertura	Identidad	E-value		
<i>Ustilago maydis</i>	3,663 pb	-	-	-		
<i>Ustilago hordei</i>	3,648 pb	88%	69%	0		
<i>Ustilago esculenta</i>	3,128 pb	86%	70%	0		
<i>Ustilago cynodontis</i>	3,596 pb	88%	70%	0		
<i>Ustilago trichophora</i>	3,181 pb	87%	72%	0		
<i>Ustilago xerochloae</i>	3,596 pb	88%	70%	0		
<i>Ustilago vetiveriae</i>	3,597 pb	98%	74%	0		
Región intergénica						
Organismo	Longitud	Cobertura	Identidad	E-value	Secuencia molde	Cadena
<i>U. maydis</i>	1,217 pb	-	-	-	UAACCCUAACC	(-)
<i>U. hordei</i>	969 pb	-	-	-	AAUCCC	(+)
<i>U. esculenta</i>	1,505 pb	-	-	-	CCCUAA	(-)
<i>U. cynodontis</i>	1,499 pb	-	-	-	-	-
<i>U. trichophora</i>	1,678 pb	-	-	-	AAUCCC	(+)
<i>U. xerochloae</i>	1,070 pb	-	-	-	-	-
<i>U. vetiveriae</i>	1,473 pb	5%	84%	1.00E-16	-	-

Tabla 8. Resumen de los alineamientos de los loci análogos con la secuencia *ter63* embebida en diversas especies de *Ustilago*.

Región 5'						
Organismo	Longitud	Cobertura	Identidad	E-value		
<i>Ustilago maydis</i>	2,023 pb	-	-	-		
<i>Ustilago hordei</i>	2,170 pb	70%	69%	1E-84		
<i>Ustilago esculenta</i>	2,254 pb	81%	74%	1E-142		
<i>Ustilago cynodontis</i>	2,152 pb	75%	71%	3E-112		
<i>Ustilago trichophora</i>	2,259 pb	79%	73%	1E-97		
<i>Ustilago xerochloae</i>	2,483 pb	75%	71%	2E-109		
<i>Ustilago vetiveriae</i>	1,975 pb	83%	76%	0		
ORF situado en el extremo 3'						
Organismo	Longitud	Cobertura	Identidad	E-value		
<i>Ustilago maydis</i>	1,462 pb	-	-	-		
<i>Ustilago hordei</i>	1,424 pb	91%	68%	4E-131		
<i>Ustilago esculenta</i>	1,368 pb	91%	68%	5E-131		
<i>Ustilago cynodontis</i>	1,366 pb	88%	69%	4E-151		
<i>Ustilago trichophora</i>	1,349 pb	91%	72%	0		
<i>Ustilago xerochloae</i>	1,408 pb	91%	69%	9E-159		
<i>Ustilago vetiveriae</i>	1,342 pb	91%	73%	0		
Región Intergénica						
Organismo	Longitud	Cobertura	Identidad	E-value	Secuencia molde	Cadena
<i>U. maydis</i>	1,495 pb	-	-	-	CUAACCCUAACCCU	(-)
<i>U. hordei</i>	6,794 pb	-	-	-	AAUCCC	(+) y (-)
<i>U. esculenta</i>	1,539 pb	-	-	-	-	-
<i>U. cynodontis</i>	1,285 pb	-	.	-	CCCUGA	(-)
<i>U. trichophora</i>	1,567 pb	-	-	-	AAUCCC	-
<i>U. xerochloae</i>	1,289 pb	-	-	-	-	-
<i>U. vetiveriae</i>	1,466 pb	-	-	-	-	-

De acuerdo a los resultados de los alineamientos mostrados en las Tablas 7 y 8, las secuencias de los marcos de lectura se encuentran altamente conservadas, tratándose posiblemente de genes ortólogos, en cambio las regiones intergénicas, aunque conservan una longitud similar sus secuencias nucleotídicas no se encuentran conservadas. Mientras el alineamiento múltiple de las secuencias intergénicas muestran que el sitio donde se localizan las secuencias putativas correspondientes al dominio molde encontradas en *U. maydis* no alinean con alguno otro en las secuencias intergénicas correspondientes (Figura 16), ya que solo algunas de estas regiones intergénicas contienen la secuencia correspondiente a este dominio o una secuencia truncada de ésta y de las cuales su localización varía de región o de cadena.

A



B

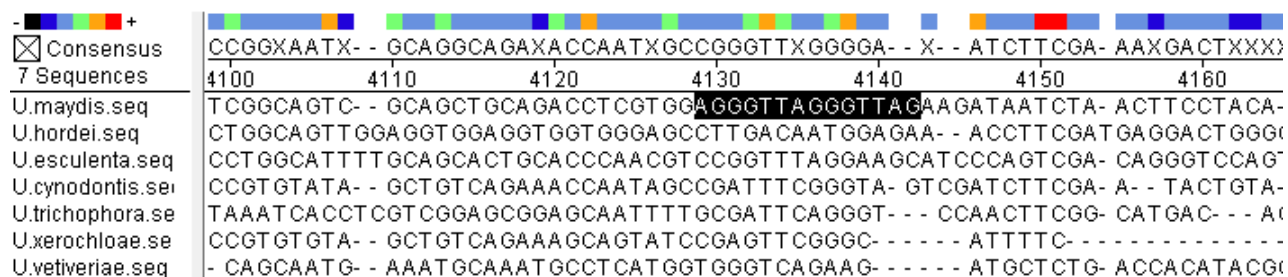


Figura 16. Alineamientos múltiples de las regiones intergénicas. (A) alineamiento correspondiente a *ter84*. (B) alineamiento correspondiente a *ter63*. Los alineamientos muestran la región donde se localizan los dominios molde putativos (subrayados en negro) encontrados en las secuencias intergénicas de *U. maydis*.

Construcción del casete de interrupción para *ter63*

Para comenzar el ensamblaje de la secuencia de interrupción para *ter63* se amplificaron las secuencias flanqueantes 5' y 3' ha dicho gen, utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3, obteniendo los fragmentos esperados de 1,158 pb y 1,030 pb respectivamente. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pBluescript KS (-) previamente linearizado con *EcoRV* (Figura 17).

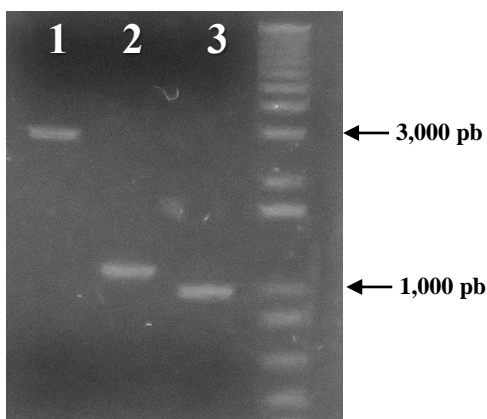


Figura 17. Linearización del vector de clonación (Carril 1) y amplificación de las regiones flanqueantes de *ter63* (Carriles 2 y 3).

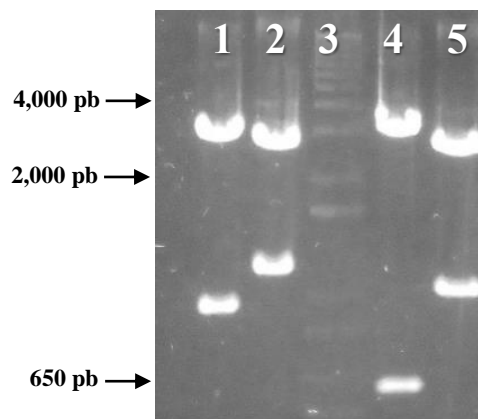


Figura 18. Perfil de restricción de los plásmidos pTer63-5' y pTer63-3'. Digestión con *EcoRI* (Carriles 1 y 4). Doble digestión con *XhoI* y *XbaI* (Carriles 2 y 5).

La presencia del inserto, así como su orientación se corroboró mediante perfil de restricción (Figuras 18 y A2), para lo primero se realizó una doble digestión con *XhoI* y *XbaI* obteniendo los fragmentos de 2,895 pb y 1,221 pb para la construcción con el flanqueante 5' denominada pTer63-5', y de 2,895 pb y 1,093 pb para la construcción pTer63-3' con el flanqueante 3'. Para determinar la orientación del inserto, el ADN plasmídico fue digerido con *EcoRI*, generando fragmentos de 3,123 pb y 993 pb en la construcción pTer63-5' y de 3,390 pb y 598 pb en la construcción pTer63-3', siendo este perfil de bandeo en ambas construcciones el correspondiente para una orientación en sentido 5'-3' (Figura A3). Para la ligación de las secuencias flanqueantes, se realizó una digestión parcial de pTer63-3' con *NotI* produciendo fragmentos de 1,067 pb, 2,921 pb y de 3,988 pb (Figura 19A) esta banda correspondiente a la construcción linearizada fue purificada y posteriormente digerida con *BamHI* obteniendo bandas de 20 pb, 1,018 pb, 2,941 pb y 3,939 pb (Figura 19B) siendo esta última escindida del gel y purificada; mientras para liberar el fragmento 5' se hizo una doble

digestión de la construcción pTer63-5' con *Bam*HI y *Not*I, obteniendo el fragmento de interés de 1,148 pb. Los fragmentos de 3,939 pb y 1,148 pb (Figura 20) correspondientes al vector e inserto respectivamente, fueron ligados para posteriormente realizar la transformación. Una vez extraído el ADN plasmídico de las presuntas transformantes con el inserto incorporado, se realizaron digestiones enzimáticas con *Not*I y *Eco*RI para corroborar tanto la presencia del inserto como la orientación (Figura A4). Obteniendo la construcción denominada pTer63-Sub5' con los fragmentos esperados de 753 pb y 4,334 pb para la digestión con *Eco*RI y de 2,166 pb y 2,921 pb para la digestión con *Not*I (Figura 21), donde la primera banda corresponde a los extremos flanqueantes 5' y 3' ligados.

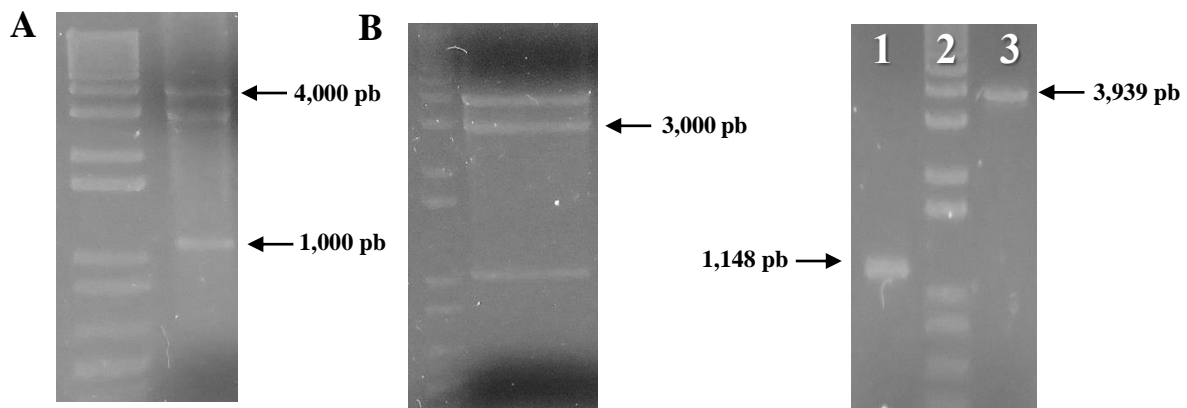


Figura 19. Digestión de la construcción pTer63-3'. (A) digestión parcial con *Not*I. (B) digestión con *Bam*HI.

Figura 20. Subclonación del extremo 5' en pTer63-3'. Fragmento *Bam*HI/*Not*I-5' (Carril 1). Vector pTer63-3' digerido con *Bam*HI y *Not*I (Carril 3).

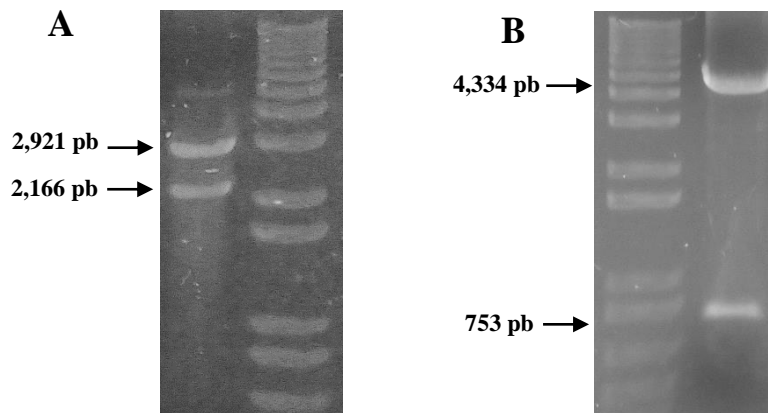


Figura 21. Perfil de restricción de la construcción pTer63-Sub5'. (A) digestión con *Not*I. (B) digestión con *Eco*RI.

Para la incorporación del marcador de selección, ambas construcciones pCM1007 y pTer63-Sub5' fueron digeridas con *Bam*HI obteniendo una banda de 5,087 pb correspondiente a la construcción pTer63-Sub5' linearizada y bandas de 4,625 pb y 2,045 pb para la digestión de pCM1007, donde el fragmento de 2,045 pb corresponde al gen *hph*. Las bandas de interés fueron escindidas y purificadas (Figura 22), a continuación, se realizó la ligación del vector (previamente desfosforilado) y el inserto. Con el producto de ligación se realizó la transformación de células competentes y posteriormente la extracción de ADN plasmídico de las colonias recuperadas. Para corroborar la incorporación del marcador de selección el ADN plasmídico fue digerido con *Bam*HI (Figura 23).

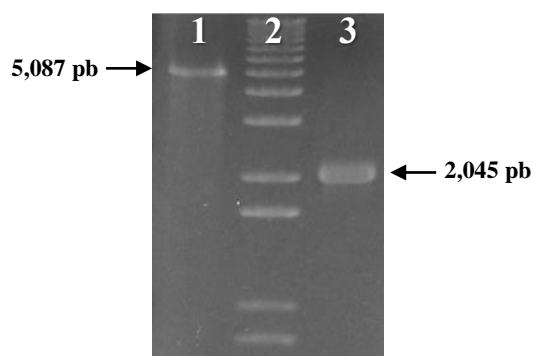


Figura 22. Purificación de la construcción pTer63-Sub5' linearizada (Carril 1) y de la banda del gen *hph* (Carril 3).

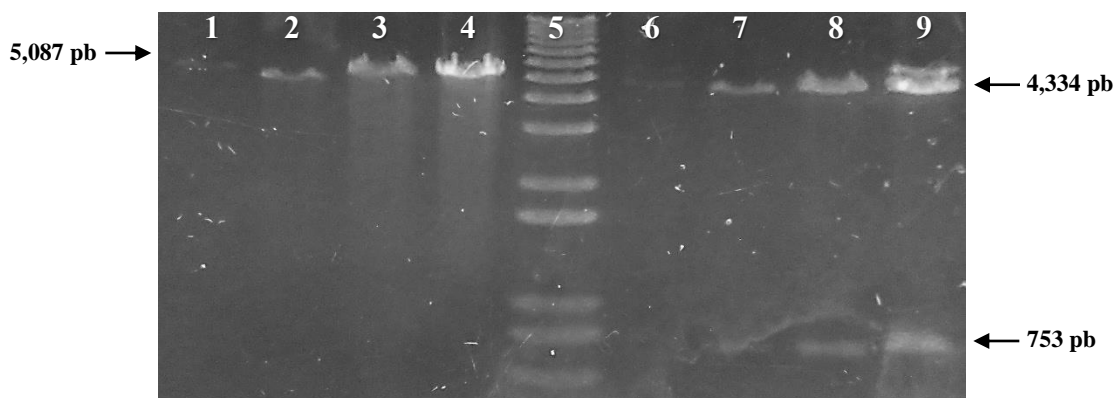


Figura 23. Digestión del ADN plasmídico de las transformantes recuperadas. Digestión con *Bam*HI (Carriles 1-4) digestión con *Eco*RI (Carriles 6-9).

DISCUSIÓN

Al contrario de la subunidad TERT y de otras proteínas asociadas a telómeros, el componente de RNA de la telomerasa no puede ser fácilmente identificado mediante enfoques computacionales y si bien se ha establecido un modelo con una estructura secundaria conservada, su identificación se vuelve una tarea difícil debido a las variaciones en tamaño y secuencias, y la posibilidad de mantener una estructura secundaria sin el requerimiento de una secuencia primaria conservada (Chen y Greider, 2000). De las transformantes en las cuales se confirmó que la integración por recombinación homóloga de la secuencia de interrupción para *ter84* se realizó de manera adecuada (Figuras 8 y 9), se seleccionaron las cepas Ter84-02, Ter84-07, Ter84-12 y Ter84-15 para su caracterización; sin embargo, el fenotipo obtenido así como el patrón de hibridación en el fragmento terminal de restricción no corresponde al reportado para mutantes del componente de RNA de la telomerasa en levaduras, en las que se ha observado que su deleción provoca una pérdida progresiva del ADN telomérico acompañado de una disminución de su potencial proliferativo y un incremento gradual en el tiempo de generación (Singer y Gottschling, 1994; Webb y Zakian, 2008). Las mutantes *ter84::hph* exhibieron una morfología macroscópica y microscópica igual al de las cepas silvestres y de igual forma la velocidad de crecimiento no se vio alterada, por el contrario el fragmento terminal de restricción muestra ligeros cambios en la migración de las bandas en la región entre 2 kb y 4 kb (Figura 14), mientras el análisis muestra que en la región donde se observa la mayor distribución del barrido telomérico (0.5 kb) no existen cambios en la longitud promedio de los telómeros. Lo anterior indica que no se produce un acortamiento de los telómeros, ni pérdida de la señal de hibridación. Mediante este análisis tampoco fue posible detectar rearrreglos que fuesen evidenciados por alteraciones en el patrón de hibridación iguales a los que ocurren en las mutantes *trt1-1* y *trt1-2*, la primera muestra pequeños amplificadores del repetido telomérico más el borde conservado de secuencias asociadas a telómeros produciendo la aparición de bandas sobreamplificadas entre la región de 0.3 kb y 1.6 kb; las mutantes *trt1-2* exhiben largos tramos heterogéneos del repetido telomérico produciendo la aparición de amplios barridos principalmente en la parte superior (Bautista-España *et al.*, 2014).

Contrario a las cepas *trt-* las mutantes *ter84::hph* no exhiben diferencias morfológicas, disminución en el potencial replicativo, y su delección no afecta el desarrollo patogénico y la terminación del ciclo de vida, estos dos últimos casos observados en los ensayos de infección en plantas donde al igual que las cepas silvestres las mutantes son capaces de producir el desarrollo de síntomas en el mismo periodo de tiempo así como un porcentaje de infección similar y la formación de agallas maduras con teliosporas. Por consiguiente, la ausencia de un fenotipo diferente al de las cepas silvestres podría deberse a que este lncRNA no está involucrado en la síntesis o control de la extensión del telómeros, y que podría ser dispensable dentro del contexto evaluado, requiriendo de condiciones específicas diferentes para su función.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis comparativo entre genomas de *Ustilago* spp. en los que se buscó en las secuencias de contigs, tanto las regiones intergénicas análogas a *ter84* y a *ter63*, así como también los ORFs situados a cada lado obtenidos del ensamble del genoma de *U. maydis* (<https://www.broadinstitute.org>). Lo anterior debido a que un enfoque similar en *Plasmodium* spp. ha permitido la identificación del componente de RNA de la telomerasa, en el cual la búsqueda de la secuencia molde (ACCCTGAACCC) del repetido telomérico de *P. falciparum* junto con el alineamiento de las secuencias nucleotídicas adyacentes en siete especies de *Plasmodium*, permitió localizar el gen que codifica para la subunidad TER en *Plasmodium* spp. embebido en una región altamente conservada; los alineamientos múltiples de los loci, demostraron que las secuencias correspondientes del dominio molde, el dominio pseudonudo y el dominio TBE del componente de RNA de la telomerasa se encuentran conservadas en *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. reichenowi*, *P. knowlesi*, *P. gallinaceum*, *P. chabaudi*, *P. berghei* y en *P. yoelii* (Chakrabarti *et al.*, 2007). Además se ha determinado que los genomas de *U. hordei* y *U. maydis*, así como también el de *Sporisorium reilianum* el cual se encuentra filogenéticamente cercano a ambas especies, presentan una alta identidad de secuencias además un alto grado de sintenia con una organización espacial conservada, exhibiendo solo en algunos casos secuencias especie-específicas, así como ligeras regiones poco conservadas y escasos eventos de translocación que condujeron a rearrreglos entre los cromosomas (Laurie *et al.*, 2012; Schirawski *et al.*, 2010).

Los alineamientos de las regiones intergénicas y de las secuencias adyacentes (Tabla 7 y 8) en conjunto con los alineamientos de la secuencia de *trt1* y ORFs contiguos (Datos no mostrados), son congruentes con lo anterior, mostrando que en los genomas de *Ustilago* spp. he incluso en *S. reilianum* (Datos no mostrados) existen regiones conservadas que presentan la misma organización espacial observada en los loci donde se localizan las secuencias *ter84* y *ter63* (Figura A1 y A2), y de igual forma al locus en el que se localiza el gen *trt1*; donde se observan marcos de lectura abierta con dominios conservados y en los primeros dos casos se sitúan secuencias intergénicas con una longitud similar a las regiones intergénicas *ter84* y *ter63* (1,344 pb y 1,440 pb en promedio para *ter84* y *ter63* respectivamente; excepto *ter63* en *U. hordei*), sin embargo, como se observa en las Tablas 7 y 8, los resultados de los alineamientos indican que estas secuencias intergénicas no presenta una estructura primaria conservada. Por otra parte, Anastacio-Marcelino y Acocal-Juárez (en revisión) determinaron la localización celular de los transcritos de *ter84* y *ter63*; donde los primeros se observaron preponderantemente localizados en el núcleo, sugiriendo alguna función exclusivamente nuclear, mientras los transcritos de *ter63* se observaron en el núcleo, así como también en el citoplasma indicando que podría ejercer alguna actividad fuera del núcleo. Aunque se ha demostrado que los genes del componente de RNA de la telomerasa varían de longitud y de secuencia entre diferentes especies (Chen y Greider, 2000), la falta de conservación de las regiones intergénicas en todos los casos, así como con los resultados preliminares del fenotipo y la localización celular observada en el caso de *ter63*, sugieren que *ter84* y posiblemente *ter63* no corresponden al gen del componente de RNA de la telomerasa de *U. maydis* y ambos se encuentran involucrados en otros procesos celulares.

Debido a que se ha observado que *U. maydis* requiere fragmentos de una longitud aproximada de 1 kb para permitir el remplazo de locus por recombinación homóloga de manera eficiente (Kämper, 2003); para la construcción del casete de interrupción para *ter63* se amplificaron fragmentos de 1,158 pb y 1,030 pb que corresponden a las regiones flanqueantes 5' y 3' respectivamente de la región central en la cual se encuentra localizado el dominio molde de la secuencia hipotética del componente de RNA de la telomerasa.

También se ha observado que mutaciones puntuales ya sea en la secuencia del dominio molde o del domino pseudonudo pueden afectar la estabilidad y procesividad de la enzima e incluso en algunos casos impedir la actividad de la telomerasa, produciendo un fenotipo senescente igual al que se obtiene al eliminar por completo la secuencia del gen codificante (Presscott y Blackburn, 2000; Gilley y Blackburn, 1997; Theimer *et al.*, 2005), por lo tanto el hecho que se cambie un nucleótido en el dominio molde del componente de RNA se refleja en la secuencia del telómero y en la eficiencia de su función, por consiguiente la delección de 421 pb que corresponden a la región central donde se localiza el dominio molde de *ter63* (Figura A2) tendría un impacto total sobre la síntesis del telómero, aun cuando no se eliminara otra cantidad mayor de nucleótidos, permitiendo garantizar la falta de funcionalidad del lncRNA, ya sea que correspondiera al componente de RNA de la telomerasa o estuviera implicado en alguna otra función, lo anterior debido a que la eliminación de una secuencia de tal longitud impactaría en la arquitectura y el adecuado plegamiento que garantizara la actividad del lncRNA.

Para la construcción del casete para la delección del molde de RNA de *ter63*, una vez amplificadas las regiones flanqueantes al sitio de interés se procedió a clonaras en el vector pBluescript KS-, posteriormente que se determinó la presencia de los insertos y su orientación (Figura 18) se realizó la subclonación del extremo 5' en la construcción pTer63-3' previamente linearizada con *Bam*HI y *Not*I (Figura 20) con la finalidad de hacer la clonación sitio dirigida, a continuación se procedió a linearizar la construcción denominada pTer63-Sub5' la cual contiene los fragmentos para recombinación en una orientación colineal, como siguiente paso con la construcción linerizada y desfosforilada se efectuó la reacción de ligación utilizando como inserto el fragmento correspondiente al marcador de selección liberado del plásmido pCM1007 digerido con *Bam*HI (Figura 22). Por último el ADN plasmídico de la clonas recuperas fue digerido con *Bam*HI y *Eco*RI (Figura 23), la primera digestión se realizó con la finalidad de verificar si el inserto se encontraba presente, debido a que solo se obtuvieron fragmentos lineales de aproximadamente 5,000 pb y no se observó la segunda banda esperada de 2,045 pb que correspondería a la banda del gen *hph*, se realizó una nueva digestión con *Eco*RI generando en todos los casos fragmentos de 753 pb y 4,334 pb indicando que los plásmidos recuperados corresponden al vector pTer63-Sub5' recircularizado; lo que demuestra que algunas moléculas del vector aún permanecen con los

extremos 5' intactos permitiendo la recircularización de dicho vector, por lo anterior se efectuaron nuevamente reacciones de desfosforilación con diversos tiempos de incubación además de reacciones de ligación incrementando la relación molar inserto/vector, obteniendo hasta el momento transformantes que contienen solamente el vector recircularizado, quedando pendiente la incorporación del marcador de selección.

CONCLUSIONES

- La interrupción del gen de lncRNA *ter84* en las cepas 521 y 518 de *U. maydis* no produce alteraciones morfológicas, incremento en el tiempo de generación, disminución del potencial replicativo o cambios en el fragmento terminal de restricción que indiquen el acortamiento de los telómeros.
- Los resultados de infección en plantas de maíz sugieren que *ter84* es dispensable para la patogenicidad, así como también para completar el ciclo de vida de *U. maydis*.
- El análisis de los loci análogos muestra que entre especies del género *Ustilago* se presenta una organización genómica altamente conservada.
- El fenotipo obtenido en conjunto con los resultados de los alineamientos indica que *ter84* se encuentra involucrado en otros procesos celulares y no participa en la homeostasis de los telómeros.

PERSPECTIVAS

- Finalizar la construcción del casete de interrupción para *ter63*, obtener mutantes *ter63*⁻ y analizar su fenotipo.
- Realizar el análisis comparativo entre los genomas disponibles de *Ustilago* spp. con las regiones presentes en *U. maydis* que contengan la secuencia del dominio molde del componente de RNA de la telomerasa.
- Recuperar nuevas secuencias intergénicas que se encuentren conservadas en diferentes especies del género *Ustilago*, para realizar nuevos análisis *In silico* y obtener secuencias con mejores oportunidades de albergar la subunidad de RNA de la telomerasa del hongo.

ANEXOS

Tabla A1. Densidad óptica a 600nm de los cultivos de las cepas silvestres y mutantes *ter84::hph*.

Cepa	518	Ter84-02	521	Ter84-15
Tiempo (Horas)	DO	DO	DO	DO
6	0.03	0.02	0.03	0.03
9	0.06	0.07	0.07	0.07
12	0.1	0.12	0.12	0.11
15	0.16	0.19	0.2	0.16
18	0.43	0.51	0.45	0.33
21	0.87	1.13	0.97	0.91
24	1.79	2.05	1.82	1.54
27	2.36	2.25	2.29	2.42
30	2.81	2.78	2.95	3.13
33	3.48	3.42	3.37	3.72

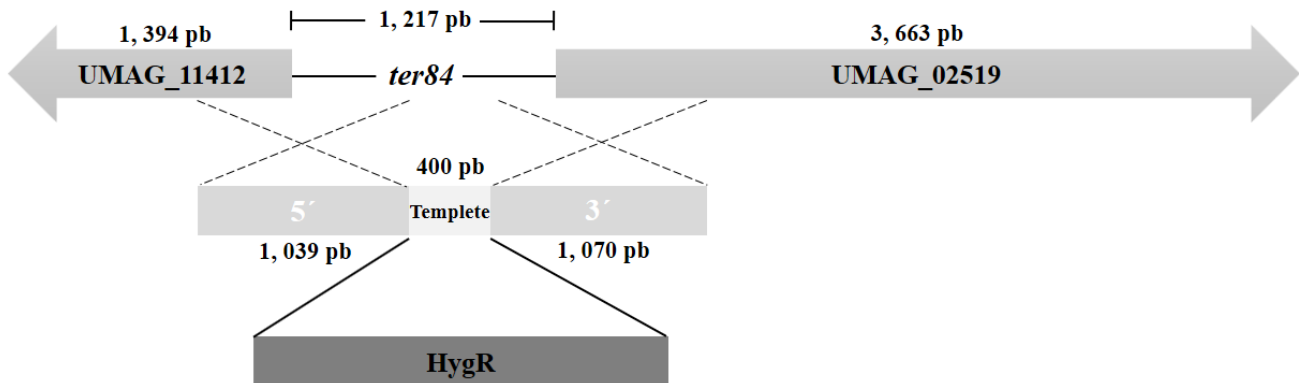
Tabla A2. Recuento celular de los cultivos de las cepas silvestres y mutantes *ter84::hph*.

Cepa	518	Ter84-02	521	Ter84-15
Tiempo (Horas)	Células/ml	Células/ml	Células/ml	Células/ml
6	1.80E+05	2.20E+05	2.20E+05	2.00E+05
9	5.00E+05	5.20E+05	4.80E+05	4.40E+05
12	2.18E+06	2.06E+06	2.10E+06	2.02E+06
15	5.14E+06	6.58E+06	5.34E+06	6.10E+06
18	2.00E+07	2.15E+07	1.79E+07	2.13E+07
21	3.90E+07	3.18E+07	3.21E+07	3.45E+07
24	8.50E+07	7.95E+07	8.00E+07	9.10E+07
27	1.04E+08	1.02E+08	9.70E+07	9.90E+07
30	1.08E+08	1.02E+08	1.04E+08	9.80E+07
33	1.16E+08	1.18E+08	1.20E+08	1.24E+08

Tabla A3. Conteo de UFC de los cultivos de las cepas silvestres y mutantes *ter84::hph*.

Cepa	518	Ter84-02	521	Ter84-15
Tiempo (Horas)	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
6	1.40E+05	1.20E+05	1.20E+05	1.60E+05
9	5.00E+05	4.40E+05	4.60E+05	4.00E+05
12	1.60E+06	1.40E+06	1.40E+06	1.20E+06
15	4.80E+06	4.40E+06	4.20E+06	4.60E+06
18	1.40E+07	1.60E+07	1.50E+07	1.55E+07
21	3.00E+07	2.80E+07	2.80E+07	2.50E+07
24	8.50E+07	8.20E+07	9.00E+07	9.30E+07
27	8.50E+07	9.00E+07	8.50E+07	9.00E+07
30	8.00E+07	8.70E+07	9.00E+07	8.40E+07
33	8.20E+07	8.40E+07	8.00E+07	8.70E+07

Chr 6

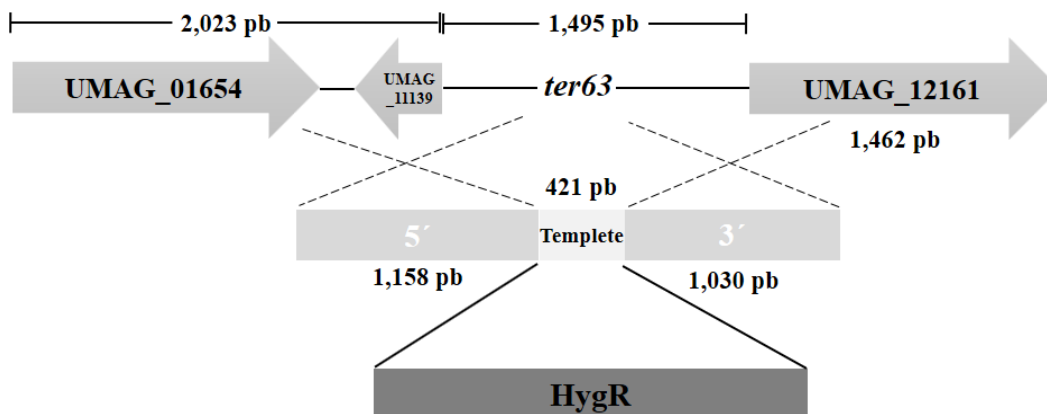


UMAG_11412 : ribosomal 60S subunit protein L43

UMAG_02519 : hypothetical protein related to ALG6 - glucosyltransferase

Figura A1. Localización genómica de la secuencia intergénica *ter84* y secuencias flanqueantes amplificadas para recombinación.

Chr 3



UMAG_01654 : hypothetical protein of unknown function

UMAG_11139 : hypothetical protein of unknown function

UMAG_12161 : hypothetical protein related to lipase family

Figura A2. Localización genómica de la secuencia intergénica *ter63* y secuencias flanqueantes amplificadas para recombinación.

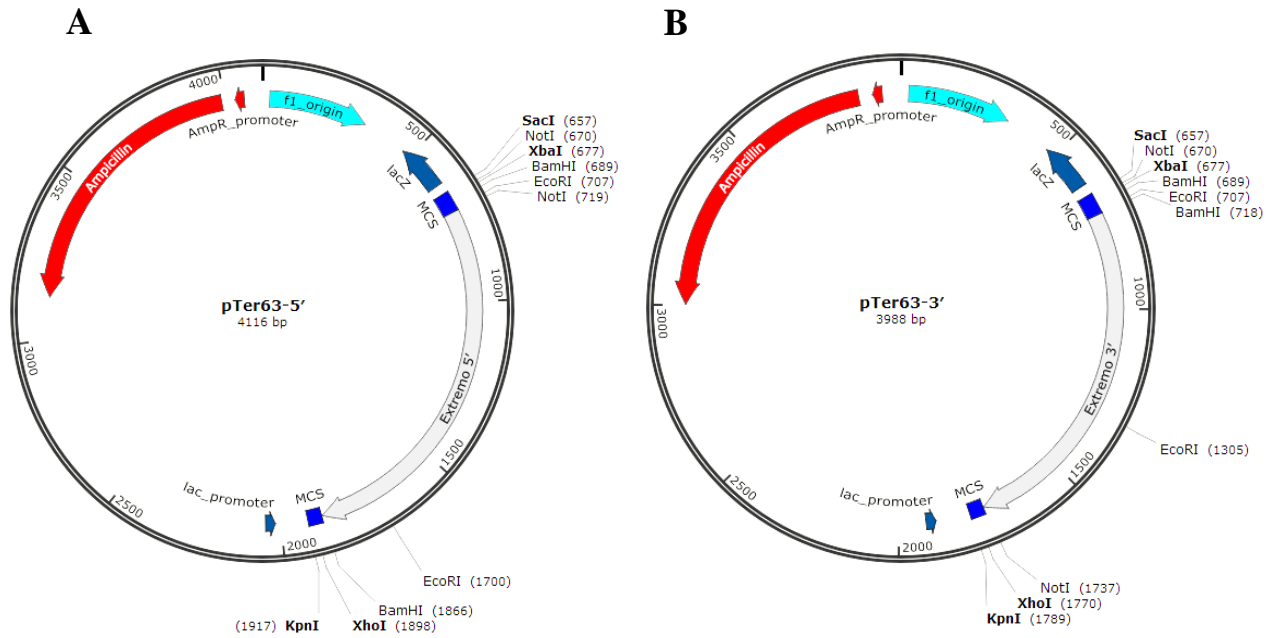


Figura A3. Diagrama de los plásmidos pTer63-5' y pTer63-3'.
(A) Clonación del fragmento 5'. (B) Clonación del fragmento 3'.

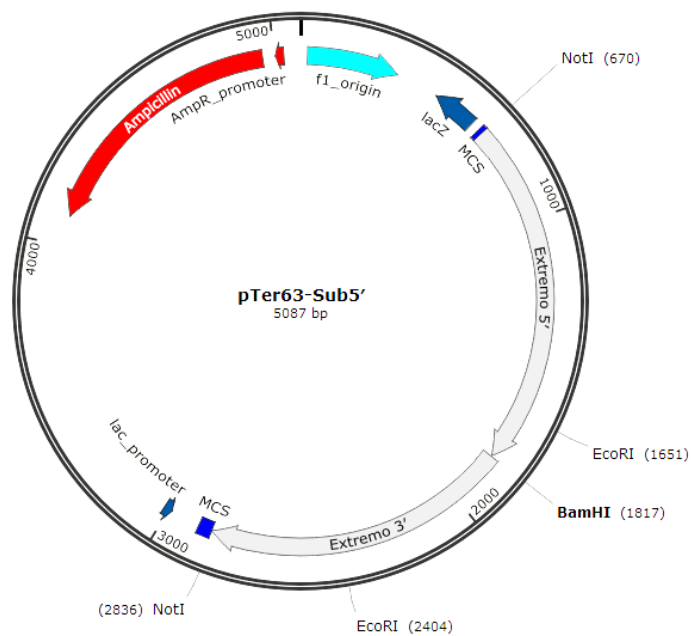


Figura A4. Subclonación del fragmento *BamHI/NotI*-5' en el vector pTer63-3'.

REFERENCIAS

Amiard, S., M. E. Gallego, y C. I. White. 2013. Signaling of double strand breaks and deprotected telomeres in *Arabidopsis*, *Front Plant Sci*, 4: 405.

Autexier, C., y N. F. Lue. 2006. The structure and function of telomerase reverse transcriptase, *Annu Rev Biochem*, 75: 493-517.

Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize, *Annu Rev Genet*, 29: 179-208.

Bautista-España, D., E. Anastacio-Marcelino, G. Horta-Valerdi, A. Celestino-Montes, M. Kojic, E. Negrete-Abascal, H. Reyes-Cervantes, et al. 2014. The telomerase reverse transcriptase subunit from the dimorphic fungus *Ustilago maydis*, *PLoS One*, 9: e109981.

Berger, S. L., y Kimmel, A. R. 1987. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Academic Pres, Inc.* Vol. 152.

Blackburn, E. H., y K. Collins. 2011. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.

Bölker, M. 2001. *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence, *Microbiology*, 147: 1395-401.

Bourns, B.D., Alexander, M.K., Smith, A.M., y Zakian, V.A. 1998. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol*, 18:5600–5608.

Brachmann, A., J. König, C. Julius, y M. Feldbrügge. 2004. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*, *Mol Genet Genomics*, 272: 216-26.

Calderón-Salais, S. 2014. Análisis *In silico* y experimental de loci *ter1* putativos de *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Chakrabarti, K., M. Pearson, L. Grate, T. Sterne-Weiler, J. Deans, J. P. Donohue, y M. Ares, Jr. 2007. Structural RNAs of known and unknown function identified in malaria parasites by comparative genomics and RNA analysis, *RNA*, 13: 1923-39.

Chappell, A. S., y V. Lundblad. 2004. Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase, *Mol Cell Biol*, 24: 7720-36.

Chen, J. L., M. A. Blasco, y C. W. Greider. 2000. Secondary structure of vertebrate

telomerase RNA, *Cell*, 100: 503-14.

E. Birney, J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, et al. 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project, *Nature*, 447: 799-816.

Fotheringham, S., y W. K. Holloman. 1989. Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes, *Mol Cell Biol*, 9: 4052-5.

Giardini, M. A., M. Segatto, M. S. da Silva, V. S. Nunes, y M. I. Cano. 2014. Telomere and telomerase biology, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 125: 1-40.

Gilley, D., y Blackburn, E. H. 1999. The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6621–6625.

Gold, S. E., G. Bakkeren, J. E. Davies, y J. W. Kronstad. 1994. Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*, *Gene*, 142: 225-30.

Griffith, J. D., L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, y T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop, *Cell*, 97: 503-14.

Guzmán, P. A., y J. G. Sánchez. 1994. Characterization of telomeric regions from *Ustilago maydis*, *Microbiology*, 140 (Pt 3): 551-7.

Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. En: Handbook of Genetics. Vol 1, King R.C. (Ed). New York: Plenum Press, pp 575–595.

Horowitz, H., Thorburn, P., y Haber, J. E. 1984. Rearrangements of highly polymorphic regions near telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 4(11), 2509-2517.

Huard, S., T. J. Moriarty, y C. Autexier. 2003. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity, *Nucleic Acids Res*, 31: 4059-70.

Kämper, J. A. 2004. PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. 271:103–110.

Kämper, J., R. Kahmann, M. Bolker, L. J. Ma, T. Brefort, B. J. Saville, F. Banuett, et al. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*, *Nature*, 444: 97-101.

Kapranov, P., J. Cheng, S. Dike, D. A. Nix, R. Dutttagupta, A. T. Willingham, P. F. Stadler, et al. 2007. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for

pervasive transcription, *Science*, 316: 1484-8.

Kuprys, P. V., S. M. Davis, T. M. Hauer, M. Meltser, Y. Tzfati, y K. E. Kirk. 2013. Identification of telomerase RNAs from filamentous fungi reveals conservation with vertebrates and yeasts, *PLoS One*, 8: e58661.

Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Güldener, U., Münsterkötter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G, et al. 2012 Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell*, 24(5):1733–1745.

Lingner, J., T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, y T. R. Cech. 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase, *Science*, 276: 561-7.

Louis, E. J., Naumova, E. S., Lee, A., Naumov, G., y Haber, J. E. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics*, 136(3), 789-802.

Louis, E. J., y Haber, J. E. 1990. Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 124(3), 547-559.

Lue, N. F., y Yu, E. Y. 2016. Telomere recombination pathways: tales of several unhappy marriages. *Curr Genet*. doi:10.1007/s00294-016-0653-8.

Ma, L., Bajic V.B., y Zhang, Z. 2013. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6):924-933.

Makarov, V.L., Hirose, Y., y Langmore, J.P. 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88: 657–666.

Mattick, J. S. 2011. The central role of RNA in human development and cognition, *FEBS Lett*, 585: 1600-16.

Mattick, J. S., y J. L. Rinn. 2015. Discovery and annotation of long noncoding RNAs, *Nat Struct Mol Biol*, 22: 5-7.

Mercer, T. R., y J. S. Mattick. 2013. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation, *Nat Struct Mol Biol*, 20: 300-7.

Mitchell, M., A. Gillis, M. Futahashi, H. Fujiwara, y E. Skordalakes. 2010. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA, *Nat Struct Mol Biol*, 17: 513-8.

- Moretti, P., Freeman, K., Coodly L., y Shore, D.** 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev*, 8: 2257–2269.
- Münsterkötter, M., y G. Steinberg.** 2007. The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*, *BMC Genomics*, 8: 473.
- Nagalakshmi, U., Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein, y M. Snyder.** 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing, *Science*, 320: 1344-9.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, y T. R. Cech.** 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human, *Science*, 277: 955-9.
- Palm, W., y T. de Lange.** 2008. How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu Rev Genet*, 42: 301-34.
- Pérez-Martin, J., S. Castillo-Lluva, C. Sgarlata, I. Flor-Parra, N. Mielnichuk, J. Torreblanca, y N. Carbo.** 2006. Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi, *Mol Genet Genomics*, 276: 211-29.
- Ponting, C. P., P. L. Oliver, y W. Reik.** 2009. Evolution and functions of long noncoding RNAs, *Cell*, 136: 629-41.
- Prescott, J. C., y Blackburn, E. H.** 2000. Telomerase RNA Template Mutations Reveal Sequence-Specific Requirements for the Activation and Repression of Telomerase Action at Telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2941–2948.
- Puhalla, J.E.** 1968. Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*, *Genetics* 60: 461–474
- Rouda, S., y E. Skordalakes.** 2007. Structure of the RNA-binding domain of telomerase: implications for RNA recognition and binding, *Structure*, 15: 1403-12.
- Ruiz-Herrera, J. y León-Ramírez, C. G.** 2012. Development and dimorphism of the pathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis*. En: *Dimorphic Fungi: Their Importance as Models for Differentiation and Pathogenesis*, Ruiz-Herrera, J. (Ed.). Bentham E Books, pp. 105-116.

Sambrook j., Fritsch E. F. y Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^{da} ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pres., USA.

Sánchez-Alonso, P., Valverde, M.E., Paredes-López, O., y Guzmán, P. 1996 Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences, *Microbiology* 142 (Pt 10): 2931–2936.

Sánchez-Alonso, P., y P. Guzmán. 1998. Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis*. RecQ-like helicase motifs at telomeric regions, *Genetics*, 148: 1043-54.

Sánchez-Alonso, P., y P. Guzmán. 2008. Predicted elements of telomere organization and function in *Ustilago maydis*, *Fungal Genet Biol*, 45 Suppl 1: S54-62.

Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M, et al. 2010 Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science*, 330:1546–1548.

Sherman, F., Fink, G. R., y Hicks, J. B. 1986. Methodos in Yeast Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

Singer, M. S., y D. E. Gottschling. 1994. *TLC1*: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase, *Science*, 266: 404-9.

Snetselaar K. M. y McCann M. P.1997. Using microdensitometry to correlate cell morphology with the nuclear cycle in *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 89:689–697.

Steczkiewicz, K., M. T. Zimmermann, M. Kurcinski, B. A. Lewis, D. Dobbs, A. Kloczkowski, R. L. Jernigan, A. Kolinski, y K. Ginalski. 2011. Human telomerase model shows the role of the TEN domain in advancing the double helix for the next polymerization step, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 9443-8.

Taft, R. J., M. Pheasant, y J. S. Mattick. 2007. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity, *Bioessays*, 29: 288-99.

Theimer, C. A., C. A. Blois, y J. Feigon. 2005. Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function, *Mol Cell*, 17: 671-82.

Theimer, C.A., Blois, C.A., y Feigon, J. 2005. Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol. Cell*. 17:671–682.

Tzfati, Y. y Chen, J. 2012. Telomerase RNA: Structure, function, and molecular mechanisms. En: Lue, N. y Autexier, C. (Eds.). Telomerases. New York, USA. pp. 53-77.

- Wai, L. K.** 2004. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review, *MedGenMed*, 6: 19.
- Wang K. y Chang H.** 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs, *Molecular Cell*, vol. 43, pp. 904–914.
- Wang, J., D. W. Holden, y S. A. Leong.** 1988. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 865-9.
- Webb, C. J., y V. A. Zakian.** 2008. Identification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* TER1 telomerase RNA, *Nat Struct Mol Biol*, 15: 34-42.
- Wellinger, R. J., y Zakian, V. A.** 2012. Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics*, 191(4), 1073-1105.
- Wilusz, J. E., H. Sunwoo, y D. L. Spector.** 2009. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world, *Genes Dev*, 23: 1494-504.
- Wyatt, H. D., S. C. West, y T. L. Beattie.** 2010. InTERTpreting telomerase structure and function, *Nucleic Acids Res*, 38: 5609-22.
- Yang, W., y Y. S. Lee.** 2015. A DNA-hairpin model for repeat-addition processivity in telomere synthesis, *Nat Struct Mol Biol*, 22: 844-7.
- Yee, A. R., y J. W. Kronstad.** 1998. Dual sets of chimeric alleles identify specificity sequences for the *bE* and *bW* mating and pathogenicity genes of *Ustilago maydis*, *Mol Cell Biol*, 18: 221-32.
- Zakian, V. A.** 1996. Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu Rev Genet*, 30, 141-172.
- Zvereva, M. I., D. M. Shcherbakova, y O. A. Dontsova.** 2010. Telomerase: structure, functions, and activity regulation, *Biochemistry (Mosc)*, 75: 1563-83.