



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas



Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Departamento de Microbiología Molecular y Celular

Tesis:

**“Caracterización parcial de cepas provenientes de las
cruzas parentales PGA 2.1 y 521”**

Mayo 2025

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura en
Químico Farmacobiólogo

Presenta

Adriana Inclán Popoca

Director de Tesis

D.C. Patricia G. Sánchez Alonso

CICM-ICUAP-BUAP - MICROBIOLOGIA MOLECULAR Y
CELULAR

Asesor de tesis

D.C. Laura Morales Lara

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS-BUAP



OFICIO C.Q./CT 001P/2024

C. Adriana Inclán Popoca
PRESENTE

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador de la Licenciatura en Farmacia, le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

“Caracterización parcial de cepas provenientes de las cruas parentales PGA 2.1 y 521”

ha sido autorizado, siendo:

D.C. Patricia G. Sánchez Alonso, Director de Tesis
D.C. Laura Morales Lara, Asesor de Tesis

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 11 de enero de 2024

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 1Bk"Lg-Nz{Jj}Wt\$Qe*Py/Oy(Br+Fz\$Aq!Xx'Et#Kq*Bp.Dn&Dq#To\$Qv&Du/Hg"Qz%He\$Fa*Yj'Ka)Vo)Gc/Kn-Cn*Zk+Lt,lq!Pr)Ho(Al\$Cc'Kq%Xh#Mu#Ex)Np+C\$Py"Ey)Mi(Eb/Vs"Jw)Ks%Fk#We(Vq'Bj)Kv.Ds,Sd%Yh\$Eg,Uv&Qx'Mm"Zd'Xx)Ab\$Py&Ts*Ub.Au&Ti*Jt,Ag'Mp(Px'Cd-Yl'Es)Cg!Fj'Xz" Fp#ZilXz&Sy+Ml"Ob%lx+Gj%Mw+Wv'Db'Cm)

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 046CR/2024

D.C. Armando Mena Contla

D.C. Candelario Vázquez Cruz

D.C. Norma Judith Cruz Ortega

Con toda atención comunico a Ustedes que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora del trabajo de Tesis que presenta la pasante de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Adriana Inclan Popoca

cuyo título es:

“CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE CEPAS PROVENIENTES DE LAS CRUZAS PARENTALES PGA 2.1 Y 521”

Asimismo, les solicitamos que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 20 de junio de 2024

Dr. Jorge Raúl Gerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas

c.c.p. Archivo

Cadena Digital: 6Qz-

Kx(Xl'Uq/Oq#Pb)Fr+Is%Gr\$ih'Fh.Nz/Br*Yr#Dy#Rv)Mn'Lo%Oj#Vj"Ga#Yz/Ia%Al)Wm\$Uy.Yw\$Yh)Eh+QulUg.Sf'Hz#Xz#Ly\$Fd'Pb
(Tr'Ab-ii#Wo'Wk&Ny&Fa#M!!e/iz&ly#Xx\$Us,He(Px"Qz)Mc,Ke/Vr"Cu(Sq/Qq%Nm%Jg.Qa"Dz\$Ds-
Zb/Dj+Hq%lu*Fj(Ia"Cc&Xp.Pj)Sr)Eb)Oo(Jf+No.Xz#Pq'In"Ku&Oz+Hs,Yf,Pc"Fm,Ga'Qb)Wn&Of"BF%

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext.7390



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



OFICIO C.Q./CT 014 A/2025

Dr. Henoc Flores Segura
Director Facultad de Ciencias Químicas
Presente.

OFICIO DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Título de la Tesis:

"Caracterización parcial de cepas provenientes de las cruzas parentales PGA 2.1 y 521"

Comisión Revisora:

Presidente: D.C. Armando Mena Contla

Firma: _____

Secretario: D.C. Candelario Vázquez Cruz

Firma: _____

Vocal: D.C. Norma Judith Cruz Ortega

Firma: _____

Los integrantes de la Comisión Revisora comunicamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de licenciatura de Químico Farmacobiólogo que presenta la estudiante **Adriana Inclán Popoca**, bajo la dirección del **D.C. Patricia G. Sánchez Alonso** y codirección de **D.C. Laura Morales Lara** por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el estudiante presente su defensa y examen, con número de matrícula **201250566**.

Atentamente

Comisión revisora

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 9 de abril de 2025

c.c.p. Archivo



Facultad de Ciencias Químicas
Av. San Claudio No. 1 Edificio FCQ 9
Ciudad Universitaria Col. San Manuel
(222)2295500 ext. 7390

Esta tesis se realizó en el Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, con el apoyo económico de la D.C. Ma. Patricia G. Sánchez Alonso

Agradecimientos especiales

D.C. Ma. Patricia G. Sánchez Alonso mi directora de tesis y jefa, quien con paciencia por estos casi 15 años me ha apoyado en todas las formas posibles dentro de sus posibilidades, además de compartir sus experiencias logrando animarme a seguir en este camino de la investigación y la ciencia.

D.C. Candelario Vázquez Cruz por sus platicas tan interesantes, momentos de alegría y todo el apoyo brindado es todo este tiempo.

D.C. Estela Anastacio Marcelino por todo lo que me enseñó a mejorar, por su gran amistad y por hacer más leves esas largas tardes de trabajo.

D.C. Antonio Celestino Montes, por ser el primer mentor en el laboratorio de microbiología molecular y celular, quien a pesar de mis escasos 17 años confió en mi para apoyarlo en sus experimentos, sin sus enseñanzas y recomendaciones en el laboratorio todo este tiempo me hubiera sido muy difícil desarrollarme en el área.

A la Doctora Judith y al Doctor Armando quienes aceptaron ser parte de mi comisión revisora, por todos los consejos recibidos.

Al Q.F.B. Adalberto Jair Hernández por su gran apoyo y amistad en el tiempo que realizó su estancia en el laboratorio.

A todos los chicos de licenciatura a quienes tuve la oportunidad de sembrar en ellos el gusto por la ciencia, espero en un futuro esa semilla crezca y sean grandes científicos. Especialmente agradezco la estancia de Fernando Ríos, Kevin Solano y Roberto Ronquillo quienes llegaron en un momento crucial de mi paso por el laboratorio, por todo el apoyo y amistad que me han brindado, además de las risas vividas.

Dedicatoria

A MIS PADRES

Quienes, aunque ya no se encuentran conmigo físicamente, siempre estarán en mi esencia y en lo que soy.

A mi papá Silverio Inclán Poblano que solo estuvo conmigo casi 10 años, pero dejó muy presente en mi vida y la de mis hermanos el que siempre debemos de trabajar arduamente para obtener lo que queremos y deseamos en esta vida, sin importar las condiciones que tengamos. “Siempre se puede ser mejor”

A mi mamá Margarita Popoca Cantero quien me enseñó que tener una Fe inquebrantable es la base para unir siempre a la familia, que debemos de aferrarnos a nuestros ideales, que nada ni nadie nos quite aquello que deseamos más que nada y por lo que hemos trabajado tanto, por todas esas palabras de aliento y consejos que seguiré toda mi vida.

Muchas gracias, por tanto. LOS AMO ETERNAMENTE

Indice

1. Antecedentes	10
2. Introducción	11
2.1 <i>Ustilago maydis</i> como modelo de trabajo	11
2.2 Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	11
2.3 Regulación de la formación de la progenie en <i>Ustilago maydis</i>	13
2.4 Los telómeros y secuencias subteloméricas	14
2.5 Telómero de <i>Ustilago maydis</i>	15
2.6 Importancia del conocimiento del extremo cromosomal	16
Justificación	17
3. Objetivos	17
3.1 General	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. Diseño de la investigación	18
4.1 Diagrama de trabajo	19
5. Materiales y métodos	20
5.1 Material	20
5.2 Material biológico	20
5.3 Equipos	20
Tabla 1. Características de los equipos	20
5.4 Métodos	21
Tabla 2. Referencia de métodos	21
6. Metodología	22
6.1 Obtención de la progenie de <i>Ustilago maydis</i>	22
6.2 Prueba <i>fuz</i> ⁺	22
6.3 Prueba <i>tum</i> ⁺	23
6.4 Extracción de DNA	24
6.5 Preparación de bloques con cromosomas embebidos en agarosa	24
6.6 Electroforesis en gel de campos pulsados	25
7. Resultados	26
7.1 Cruzas en plántulas de maíz	26

7.2 Porcentajes de infección en plántulas de maíz por <i>Ustilago maydis</i>	28
7.3 Tumores obtenidos de la cruce de cepas de <i>Ustilago maydis</i>	29
7.4 Porcentaje de germinación de teliosporas de <i>Ustilago maydis</i>	30
7.5 Comparación de la morfología colonial en la germinación de teliosporas	31
7.6 Selección de progenie en placas de carbón activado para obtener colonias de células haploides	32
7.7 Determinación del tipo a de apareamiento.....	33
7.8 Cariotipo electroforético para el análisis cromosomal de la progenie seleccionada.....	35
8. Discusión de resultados.....	37
9. Conclusiones	40
10. Referencias	41

1. Antecedentes

Robin Holliday en su publicación *Ustilago maydis* de 1974 describió las ventajas que presentaban las levaduras para su estudio genético en comparación con los hongos filamentosos siendo estas muy considerables, entre estas ventajas se encuentran la clasificación de fenotipos de la progenie que se obtiene por los cruces, la replicación con aspecto aterciopelado que facilita enormemente su aislamiento, la facilidad de crecimiento de células uninucleadas en medios líquidos que permiten el procedimiento de experimentos fisiológicos y bioquímicos.

Plinio A. Guzmán *et al.* en 1994 realizaron la caracterización de los extremos cromosomales de cepas de laboratorio de *Ustilago maydis* mediante el uso de electroforesis de campo pulsado.

Khalid Meksem *et al.* en su estudio de 2005 obtuvieron a su vez un mapa físico de la cepa 521 de *Ustilago maydis* a partir de clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC).

En 1996 Sanchez Alonso *et al.* realizaron la detección de la variabilidad genética de algunas cepas de *Ustilago maydis* mediante sondas derivadas de secuencias teloméricas. En este trabajo se observó que estas sondas tenían el potencial de detectar patrones altamente polimórficos dentro de los sitios *TAS* e intersticiales del cromosoma, presencia o ausencia de bandas distintivas así probando que el enfoque utilizado en ese trabajo fue adecuado para utilizarse ese esquema para otro sistema fúngico.

La Doctora Bannuet *et al.* en 2002 llevaron a cabo diferentes ensayos en donde analizan de manera excelente la morfogénesis en los brotes de *Ustilago maydis* mediante el uso de diferentes cepas, fármacos y tinciones describiendo cómo es que se da la gemación de las células y corroboraron cual es el papel de las MAPK cinasas en la morfogénesis y patogenicidad.

En la bibliografía consultada se observa que la investigación científica en el modelo de *Ustilago maydis* ha generado importantes descubrimientos que son un gran avance en la genética microbiana.

2. Introducción

2.1 *Ustilago maydis* como modelo de trabajo

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto dimórfico, que pertenece al grupo de los Ustilaginales y forma parte muy importante del grupo de hongos fitopatógenos, como lo mencionan los investigadores Brefort Tomas en el 2009 reconociendo a este basidiomiceto como uno de los pocos modelos para una verdadera relación biotrófica (Brefort T. *et al.*, 2009; Ollaf M. *et al.*, 2008). *Ustilago maydis* establece una relación biotrófica con el huésped que lo contiene por lo que éste permanece vivo aun cuando el crecimiento del hongo sea masivo. Se infiere que su genoma se encuentra equipado con las enzimas necesarias para lograr este desarrollo además de utilizar nuevos efectores de proteínas que secreta que son cruciales para suprimir la respuesta inmune de la planta (Wahl R. *et al.*, 2008). Este hongo es usado para el estudio de: patogenicidad, dimorfismo, reparación del DNA, control de su ciclo celular, recombinación y se están iniciando estudios en el metabolismo del telómero (Sánchez A. *et al.*, 1996; Holloman W. *et al.*, 2008; Sánchez A. *et al.*, 2008; Eun Y. *et al.*, 2017).

El hongo *Ustilago maydis* infecta a plantas de maíz (*Zea mays*) primordialmente (Kronstad. J., 2008) siendo este el principal recurso utilizado para la obtención de teliosporas para su posterior análisis. Los primeros trabajos en este hongo fueron realizados por Christensen y Stackman de 1930 a 1950, y, Robin Holliday lo elevó a modelo para estudios moleculares sobre recombinación.

Ya varios investigadores han demostrado que el uso del modelo *Ustilago maydis* es muy adecuado para estudiar la estructura de los telómeros ya sea su organización, o el metabolismo asociado a su mantenimiento (Sánchez A. *et al.*, 1996; Holloman W. *et al.*, 2008; Sánchez A. *et al.*, 2008; Eun Y. *et al.*, 2017).

2.2 Ciclo de vida de *Ustilago maydis*

El ciclo de vida de *Ustilago maydis* ocurre en varias etapas, Banuett *et al.* en 2002 analizaron y describieron el proceso de infección, observando primero que las células haploides se reconocen entre sí mediante un sistema de feromonas (Figura 1, paso 1), este gradiente de feromonas dirige

al desarrollo de tubos de conjugación en células compatibles, para que mediante este reconocimiento se pueda llevar a cabo el apareamiento por medio de la plasmogamia (Figura 1, paso 2). Posterior al reconocimiento ocurre la fusión de células haploides se origina la forma dicariótica en la superficie de la planta y la formación del tubo germinal (Figura 1, paso 3) o inicio de lo que posteriormente serán las hifas. La segunda etapa consiste en la invasión de las hifas al hospedero y la proliferación del hongo entre y dentro del células del hospedero (Figura 1, paso 4). La tercera etapa provoca la alteración del control de crecimiento del hospedero y también la inducción de formación de tumores. En la siguiente etapa se da la formación de material mucilaginoso (Figura 1, paso 5), la cariogamia (Figura 1, paso 6), la fragmentación de la hifa y además la célula empieza a tomar una forma redondeada; se da una reorganización de los mecanismos para el crecimiento polarizado y la secreción de varios componentes fúngicos (Figura 1, paso 7). En la penúltima etapa que es la quinta se presenta el agregado de una pared celular especializada y comienza la producción de teliosporas maduras (Figura 1, paso 8). En la sexta y última etapa ocurre la germinación de las teliosporas, meiosis, y la generación de la forma haploide reiniciando el ciclo de infección (Figura 1, paso 9). (Banuett F. *et al.*, 2002).

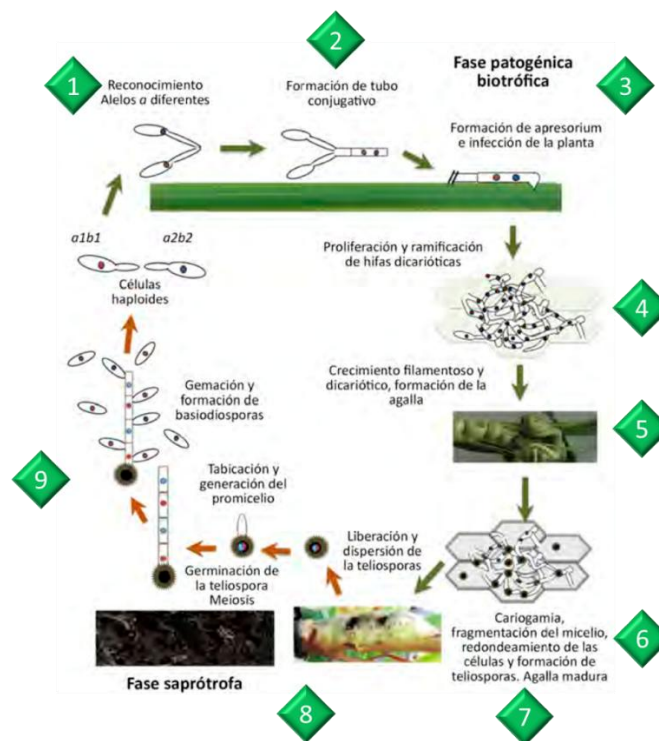


Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. En el diagrama se representan de manera esquemática las dos formas vegetativas de vida del hongo: micelio patógeno dicariótico y esporidia saprotrófica

haploide. En la fase de teliospora se producen células que son una forma de resistencia y dispersión de la enfermedad. Las flechas verdes indican los estados de desarrollo dentro del hospedero, las flechas de color marrón indican los estados de germinación y desarrollo en el medio ambiente (Sánchez A. *et al.*, 2018).

2.3 Regulación de la formación de la progenie en *Ustilago maydis*

El control de su transición dimórfica y del estilo de vida se encuentran acoplados y están controlados por dos *loci* genéticos: el locus *a* y el locus *b*. El primero es un locus bialélico compuesto por dos genes que codifican un precursor de ferhormona *mfa1* o *mfa2*, y dos genes para el receptor de la feromona del tipo de apareamiento complementario *pra2* o *pra1*, este último es una proteína transmembranal de tipo de siete dominios que se encuentra acoplada a proteínas G (Fedler M, *et al.*, 2009; Nieto F, 2012).

Después de percibir las feromonas del tipo de apareamiento opuesto, la señal se transmite por una ruta de MAP cinasas y converge en la expresión de *prfl* con la ruta que percibe señales del medio ambiente como pH, ácidos grasos y glucosa. *prfl* es un regulador maestro que controla la expresión de otros factores transcripcionales que controlan la mitosis, el ciclo celular, la transición dimórfica, la plasmogamia de las células compatibles y el crecimiento filamentoso del dicarion, genera un apresorio para la penetración de la planta, y desencadenan una serie de eventos que controlan paso a paso el proceso de infección de la planta a través de una serie de moléculas señalizadoras y de relevo de la señal, factores transcripcionales y efectores que conducen el estilo de vida biotrófico del hongo (Doehle G. *et al.*, 2008). Por su parte, el locus *b* es multialélico, con alrededor de 30 alelos diferentes reportados y referencias (Kamper J, *et al.*, 1995), está compuesto por un par de genes divergentes *bE* y *bW* que codifican las proteínas *bE* y *bW*, las cuales forman un factor transcripcional heterodimérico solo cuando provienen de alelos diferentes (Kamper J. *et al.*, 1995; Yee A. *et al.*, 1998). Como lo menciona Banuett. F. *et al.* en 2002 el heterodímero *bE/bW* es quien gobierna la transición dimórfica, la expresión de genes exclusivos de la fase patogénica biotrófica y mantiene la fase micelial hasta la producción de teliosporas maduras, que no se forman sin la participación de este complejo (Banuett F. 2002; Wahl R. *et al.*, 2010). Este hongo al crecer de forma filamentosa invade los tejidos de la planta, desarrollándose intracelularmente y en el

apoplasto, donde se embebe en una matriz mucilaginoso cuya función puede ser protectora. En un punto durante el crecimiento filamentoso ocurre la cariogamia en las células miceliales y se forman las células diploides; cuando ocurre los micelios se fragmentan, se redondean las células y se generan las teliosporas, siendo estas la forma de resistencia del hongo y de dispersión de la enfermedad. Estas células son elipsoidales equinuladas y pigmentadas de color oscuro; se consideran la tercera forma del hongo, aunque esto no significa que sea trimórfico (Brefort T. *et al.*, 2009; Banuett F. 2002).

2.4 Los telómeros y secuencias subteloméricas

Según estudios realizados por diferentes investigadores tanto de nivel nacional e internacional *Ustilago maydis* es uno de los diez fitopatógenos más importantes para estudios de patogenicidad, dimorfismo, señalización molecular, control del ciclo celular, biorremediación, metabolismo de RNA, recombinación y reparación de DNA, y se está iniciando como modelo para el estudio del metabolismo del telómero entre otras líneas de investigación (Banuett F. *et al.*, 1989; Hansen K. *et al.*, 2006; Perez M. *et al.*, 2006; Basse C. *et al.*, 2004; Mao N. *et al.*, 2007; Holloman W. *et al.*, 2008; Brefort T. *et al.*, 2009; Dean R. *et al.*, 2012; Donaldson. M. *et al.*, 2013; Idbrugge M. *et al.*, 2013; Sánchez A. *et al.*, 2018)

El hongo *Ustilago maydis* es dócil para obtener cultivos *in vitro* de la fase haploide a partir de las agallas del carbón del maíz, lo que facilita la adquisición de cepas del medio ambiente, y es fácil de cruzar con otras cepas homólogas de interés en el laboratorio. Además, no requiere infraestructura especializada para su crecimiento, crece tanto en medios complejos como sintéticos, puede transformarse elaborando protoplastos, la transformación es relativamente fácil y las mutantes pueden analizarse mediante diferentes estrategias; la elaboración de mutantes en múltiples genes permite la disección de cascadas regulatorias que controlan su ciclo vida (Banuett F. *et al.*, 2002).

Los extremos cromosómicos de los eucariotas suelen ser ricos en secuencias de ADN repetidas; estos son los repetidos teloméricos. Según sus reportes, Blackburn en 1994 en el extremo del cromosoma se encuentran secuencias cortas repetidas en tándem; *Biessman et al (1997)* reportaron secuencias repetidas de gran tamaño del tipo retroposición de repetición terminal no larga en los

extremos cromosomales de *Drosophila melanogaster*. Las secuencias cortas de ADN son las más comunes y están muy conservadas entre las eucariotas, mientras que las de tipo retroposición de repetición terminal no larga se han descrito en los miembros del grupo Diptera (Kalmykova and Slokova (2023). Biochemistry)..

Adyacente al extremo cromosomal formado por los repetidos teloméricos, las secuencias asociadas al telómero (TAS) no están tan conservadas como las repeticiones teloméricas y en la mayoría de los casos son polimórficas en el genoma y albergan una mezcla de elementos repetitivos (Louis *et al.* 1994; Rehmeier C. *et al.*, 2009).

Se ha reportado que las secuencias asociadas al telómero (TAS) forman arreglos en el mosaico de secuencias que son exclusivas del extremo cromosomal. Estas secuencias se encuentran en eucariotes de forma moderadamente repetidas especie-específicas (Flint J. *et al.*, 1997; Louis E. *et al.*, 1994; Rehmeier C. *et al.*, 2009; Sánchez A. *et al.*, 1998), adicionalmente pueden encontrarse retrovirus, retrotransposones o reminiscencias de éstos, algunos marcos de lectura abierta (MLA) relacionados con variación antigénica, genes de contingencia y, en hongos, con frecuencia se hallan MLAs con homología a helicasas tipo RecQ denominadas TLH (Telomere Linked Helicase) (Barry J. *et al.*, 2003; Ekanayake D. *et al.*, 2007; Hansen., *et al.*, 2006; Louis E. *et al.*, 1992; Sánchez A. *et al.*, 1998).

2.5 Telómero de *Ustilago maydis*

Las regiones teloméricas de este hongo muestran la secuencia *TTAGGG*, repetida en tándem al menos 37 veces en los terminales cromosómicos (Guzmán and Sánchez, 1994), que es idéntica a las repeticiones teloméricas encontradas en humanos y otros vertebrados, así como en algunos protozoos y mohos.

Acerca del TAS, se ha revelado que contiene dos tipos principales de secuencias, que se denominan *UTASa* y *UTASb* la primera se encuentra muy persistente adyacente al repetido telomérico, mientras que *UTASb* parece formarse por subjerarquías de secuencias moderadamente repetidas y se encuentra menos conservada, además, a la fecha no se ha estudiado con profundidad.

En un nuevo enfoque para analizar la variabilidad genética, en *Ustilago maydis* se utilizó el análisis del patrón de hibridación de las secuencias *UTASa* para obtener patrones distintivos de aislados de

Ustilago maydis recogidos en tres zonas geográficas diferentes y de dos cepas estándar de laboratorio. Este análisis permitió identificar patrones distintivos para cada grupo de cepas, aunque no se realizaron los análisis para determinar si la variabilidad no generaba problemas para su uso como marcador molecular. (Sánchez- Alonso and Guzmán., 1998; Sánchez-Alonso *et al.*, 1996).

2.6 Importancia del conocimiento del extremo cromosomal

Gran parte de la maquinaria metabólica para el mantenimiento del extremo cromosomal de *Ustilago maydis* y la secuencia TTAGGG en el repetido telomérico se comparte con algunos vertebrados y algunas plantas. En el análisis realizado por Sánchez -Alonso y Guzmán en 1998 se reportó que *UTASa* contiene un marco de lectura abierta que codifica una helicasa con homología a las de la subfamilia de RecQ a la que denominaron arbitrariamente *USHER*, aunque su papel en el metabolismo de los ácidos nucleicos aún no se ha dilucidado.

Prácticamente en todos los organismos estudiados los repetidos del telómero y las TAS se transcriben generando transcritos nombrados TERRA (*TElomere Repeat containing Ribonucleic Acid*), nuestro equipo de trabajo se encuentra investigando si estos transcritos tienen un tamaño promedio que ayuden a identificar elementos genéticos que controlen la transcripción, además se investigan los productos de su traducción (Arora *et al.*, 2011)

Rehmeyer *et al.*, en el 2009 se plantearon la posibilidad de que mediante el uso de análisis bioinformático pudieran encontrar al menos un ejemplar completo de *USHER* en el genoma de *Ustilago maydis* con dominio de dedos de zinc (Rehmeyer, *et al.*, 2009), y así poder analizar si hay alguna conexión entre las funciones de las TLH sobre el metabolismo primario de DNA. Por ello, es de gran interés, conocer si estas secuencias logran expresarse hasta proteína y saber cuál sería el impacto de su sobreexpresión en un sistema homólogo y heterólogo.

En este trabajo analizaremos el cariotipo electroforético de algunas cepas que son progenie del cruce entre la cepa 521, que presenta abundantes repetidos *UTASa* en sus extremos cromosomales de manera natural, y PGA2.1, que tiene, de manera natural un escaso número de copias de las secuencias *UTASa* en algunos de sus extremos cromosomales; de esta manera nos podemos dar una idea de cómo se van adquiriendo inicialmente más copias del repetido de una manera relativamente sencilla y que se podrá completar mediante el análisis PFGE.

Justificación

Debido a la información sobre la caracterización que podría obtenerse de la progenie de cepas de *Ustilago maydis* con diferencias en la estructura del extremo cromosomal, se hace necesario llevar a cabo el cruce de cepas parentales con estas diferencias para la obtención de cepas postmeióticas cuyos extremos cromosomales sean útiles para un análisis molecular de telómeros más extensos.

3.Objetivos

3.1 General

Obtener y analizar progenie postmeiótica de *Ustilago maydis* de la cruce de PGA2.1 y 521 y analizar el cariotipo electroforético de estas cepas.

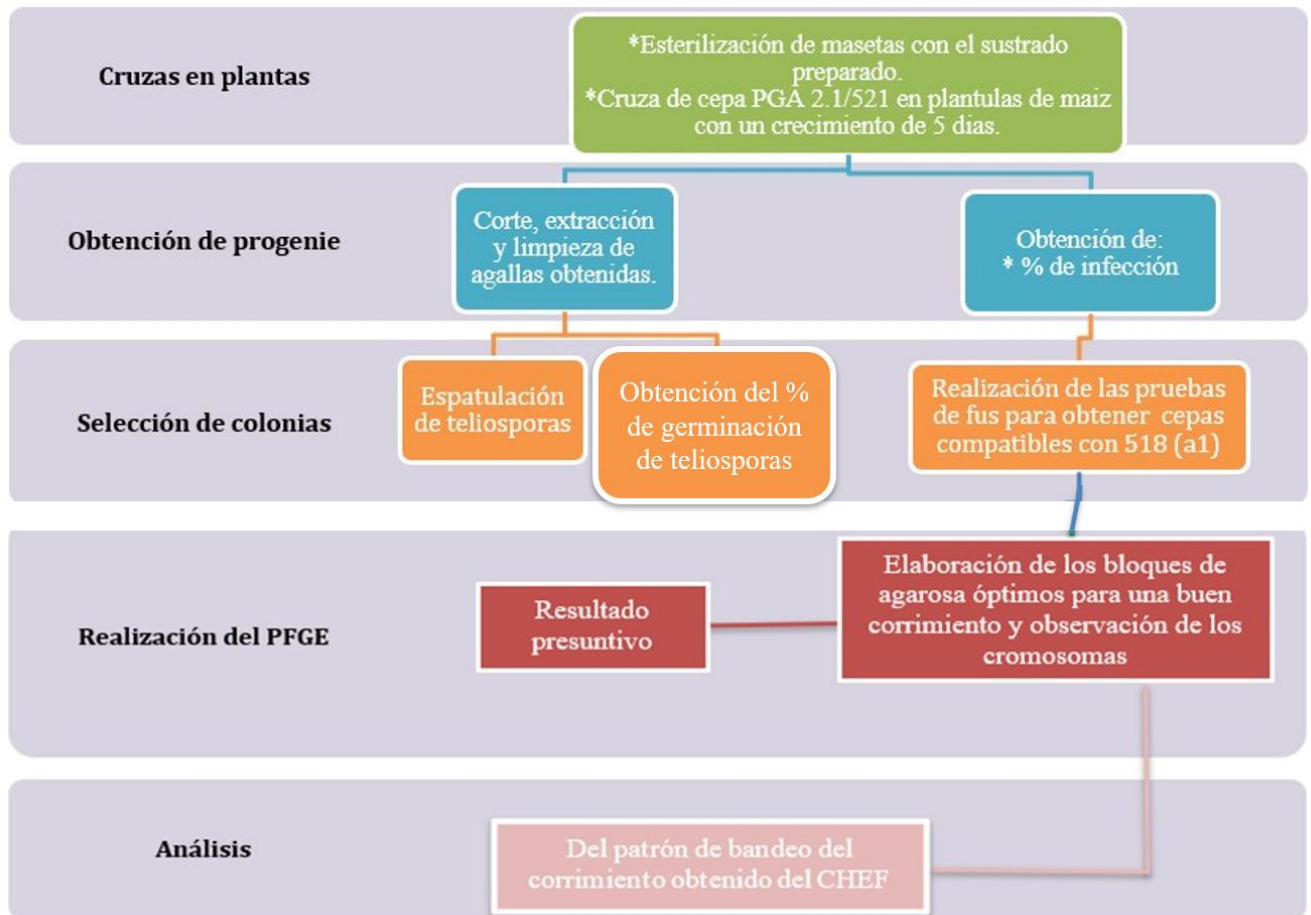
3.2 Objetivos Específicos

- Obtener la progenie de la crucea *in planta* de las cepas 521 y PGA2.1.
- Seleccionar las colonias deseadas para su análisis.
- Adaptar la técnica de preparación de DNA de alto peso molecular embebido en agarosa a *Ustilago maydis*.
- Obtener y analizar los cariotipos electroforéticos.

4. Diseño de la investigación

- a) Tipo de estudio: **Prospectivo**
- b) Universo del estudio: **Progenie de las cepas de *Ustilago maydis* 521 y PGA2.1**
- c) Sede y lugar del estudio: **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas departamento de Microbiología Molecular y Celular.**
- d) Criterios de selección (criterios de inclusión y criterios de exclusión): **Solamente se usará la progenie obtenida de la cruce realizada de las cepas PGA 2.1 y 521.**
- e) Recursos humanos: **D.C Patricia Sánchez Alonso**
- f) Recursos financieros: **D.C Patricia Sánchez Alonso.**
- g) Diseño estadístico: **Estadística no paramétrica.**

4.1 Diagrama de trabajo



5. Materiales y métodos

5.1 Material

- Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico para la obtención de progenie de las cruza de cepas de *Ustilago maydis* y su análisis.
- Sustrato para plantas.
- Invernadero.

5.2 Material biológico

- Cepas PGA2.1 (colección MIMOCE) y 521 donadas por el Dr. W.K.Holloman (Cornell Weill Medical College, NY USA), progenie obtenida de la cruza de éstas.
- Plántulas de maíz MCS-02

5.3 Equipos

Tabla 1. Características de los equipos

EQUIPO	MARCA	MODELO
C.H.E.F	Bio Rad	Dry II
Centrífuga	Eppendorf	5801
Incubadora De Agitación	LAB-LINE	ORBIT
Microcentrífuga	Lab Net	Spectrafuge 24D
Termoblock	VWR company	VWR Scientific
Espectrofotómetro	THERMO SCIENTIFIC	Genesys 10S UV-VIS
Campana De Flujo Laminar	NOVATECH	N/V
Vortex	Scientific Industries	GENIE 2
Micropipetas	Brand	Transferpette S
MICROPROCESSOR pH Meter	HANNA INSTRUMENTS	pH 211
Cámara De Electroforesis	EASY CAST	OWL
Fotodocumentador	Ultra-Violet Products	BioDoc-It Imaging System

Transiluminador	Ultra-Violet Products	TL-2000 ULTRAVIOLET TRANSLINKER
Balanza analítica	ACCULAB	VICOB
Microscopio	VELAB-MICROSCOPES	VE-B6
Baño María	PRECISION	180 SERIES WATHER B.

5.4 Métodos

Tabla 2. Referencia de métodos

DETERMINACIÓN	MÉTODO	REFERENCIA
Crecimiento de células	Estría cruzada y en medio líquido	Holliday R.1974
Obtención de progenie	Infección <i>in vitro</i> plántulas de maíz	Banuett F. <i>et al.</i> 1989
Prueba de fuz+	Cruza de células compatibles	Holliday R.1974
Prueba de tum+	Infección <i>in vitro</i> plántulas de maíz	Banuett F. <i>et al.</i> 1989
Extracción de DNA	Mecánico	Holliday R.1974
Elaboración de bloques de agarosa	Preparación de bloques con cromosomas embebidos en agarosa	Kinscherf T. <i>et al.</i> 1988
Identificación del patron de bandeo cromosomal	Electroforesis en gel de campos pulsados	Kinscherf T. <i>et al.</i> 1988

6. Metodología

6.1 Obtención de la progenie de *Ustilago maydis*

Se deben extraer las teliosporas de los tumores cosechados en invernadero, o colectados en forma aséptica utilizando pinzas, bisturí, estériles.

A los cúmulos de tejido con teliosporas agregar 1 mL de CuSO_4 al 1%, disgregar el tejido en tubo de polipropileno de 1.5 mL; dejar asentar las partículas macroscópicas, colectar la suspensión de teliosporas en otro tubo de centrifuga y dejar 2 -5 h a temperatura ambiente.

Colectar las teliosporas por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min, descartar el sobrenadante y lavar con agua destilada estéril 2 veces y resuspender la pastilla en 1 mL de agua destilada estéril. Contar las teliosporas en un hemacitómetro y hacer los cálculos para obtener 100, 1000, 10,000, 100,000 teliosporas en un volumen de 50 μL , y espatularlos en medio completo (MC) de *Holliday R. 1974*, adicionado de ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Incubar a 28° - 30°C durante 20 h, las colonias deben ser muy pequeñas para cosechar la progenie. Agregar 2 mL de agua estéril bidestilada a la placa y colectar en un tubo de Falcón de 15 mL las colonias de esporidias ayudado de una espátula de vidrio y homogenizar.

Agitar en vortex suavemente y contar las esporidias en hemacitómetro para ajustar a 100 esporidias aproximadamente por volumen $\leq 50 \mu\text{L}$, espatular en cajas de medio completo del Holliday, e incubar a 28°C - 30°C. Replicar manualmente 100 colonias en MC con carbón activado pH=7.0 para seleccionar levaduriformes. Amplificar la población deseada y guardar en DMSO 7% en ultracongelador.

6.2 Prueba *fuz*⁺

Del plaqueo anterior, tomar una colonia aislada de *Ustilago maydis*, y sembrar en un tubo con 5 mL YEPS (1% extracto de levadura, 2% peptona de caseína, sacarosa al 2%); dejar crecer a 28° C - 30° C con aereación y hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600} = 1.2 - 2.0$ y sembrar 50 μL del precultivo por duplicado en 20 mL de medio de cultivo, utilizando matraces de 100 mL.

Incubar hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600} = 1.6$, centrifugar 2,500 rpm en una centrifuga de mesa durante 10 min, eliminar el sobrenadante y resuspender en un volumen igual de MC.

Gotear 10 μ L de los cultivos de las cepas de referencia ordenadamente sobre placas de MC adicionado con carbón activado al 1%, y sobre éstas colocar 10 μ L del cultivo de las cepas a probar. Dejar secar las gotas en una cámara de flujo de aire laminar para mezclar las células sin mover. Incubar de 24 h a 48 h a 30° C. La prueba positiva se observará como un crecimiento blanco aterciopelado, las pruebas negativas se observan como un crecimiento marfil cremoso de las cepas.

6.3 Prueba *tum*⁺

De un cultivo de *Ustilago maydis* de 24 -36 h en medio YEPS gelificado, sembrar una colonia de la cepa a probar en un tubo con 5 mL de medio de cultivo YEPS, y dejar crecer hasta alcanzar una D.O.₆₀₀=1.0.

Se inocularán 50 μ L del precultivo por duplicado en 20 mL de medio de cultivo, utilizando matraces de 250 mL. Incubar hasta alcanzar una D.O.₆₀₀= 1.6 – 2.0.

Cosechar las células centrifugando a 2500 durante 10 min.

Lavar las células con 10 mL de agua estéril, centrifugar y eliminar el agua de lavado. Resuspender en 10 mL de agua estéril, contar el número de células en hemacitómero y ajustar el volumen hasta obtener una suspensión de 10⁹ cel. / mL.

Mezclar las células del cultivo de interés con las de las cepas de referencia (cultivadas de igual manera) para obtener un inóculo en relación 1:1 e inocular en un término de 1h, 100 μ L de la suspensión anterior (10⁸ cel aprox.) en plántulas de maíz de 5 a 7 días de emergidas con ayuda de una jeringa de insulina.

La inoculación se realiza en el tallo, 2 cm arriba del cuello de la raíz aproximadamente. Alrededor del día 9 post inoculación comienza a verse los síntomas de la infección. A partir del día 15 puede cosecharse la agalla, la cual se guarda en sobres de papel hasta el uso del material biológico.

Para la infección de plántulas y obtención de tumoraciones, registre cada tercer día la historia de la infección en cada una de las plántulas utilizadas; a los 15 días registre la aparición de agallas maduras en los controles si las hay, a partir del día 20 a 22 puede cosecharse la agalla, la cual se guarda en sobres de papel hasta su uso.

6.4 Extracción de DNA

De un precultivo de 24 h de *Ustilago maydis* crecido en YEPS (1% extracto de levadura, 2% peptona de caseína, sacarosa al 2%) a 30° C con aereación, inocule 100 µL en matraces de 125 mL conteniendo 25 mL de YEPS. Incube nuevamente a 30° C con aereación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀=1.2 (aprox 20-24 h).

Coseche las células por centrifugación a 2,000 rpm a temperatura ambiente; descarte el sobrenadante y resuspenda en 5 mL de buffer SCE (1M sorbitol, 40 mM citrato de sodio pH=5.8, 10 mM EDTA) y centrifugue como se describe en el paso anterior y repita el lavado una vez más. Resuspenda la pastilla en 400 µL de SCE y agregue entonces 10 -20 µg de Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) resuspendidos en 100µl de SCE.

Incube a 30°C durante 10 min. y verifique la formación de protoplastos.

Coseche los protoplastos por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min.

Retire el sobrenadante con una micropipeta, y agregue 1 mL de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH=8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS); mezcle hasta homogenizar y agregue entonces 500 µL fenol-cloroformo (fenol saturado en T.E. pH=8.2 mezclado a partes iguales con cloroformo), tape bien el tubo y agite manualmente hasta lograr homogenizar la emulsión. Centrifugue 15 min a máxima velocidad en microcentrífuga y transfiera el sobrenadante a otro tubo de polipropileno de 1.5 mL.

Extraiga una vez más con fenol-cloroformo, y recupere el sobrenadante en otro tubo.

Lave con un volumen igual de cloroformo, y recupere la fase acuosa (superior) centrifugando 3 min a máxima velocidad.

Transfiera la fase acuosa a un tubo nuevo y añada 0.6 vol. de isopropanol. Deje a temperatura ambiente durante 30 min y recupere la pastilla de DNA por centrifugación; enjuague la pastilla dos veces en etanol al 70%, retire el etanol, y resuspenda el DNA en 30 µL de agua destilada estéril.

6.5 Preparación de bloques con cromosomas embebidos en agarosa

Obtención de protoplastos. De una placa fresca de cultivo de *Ustilago maydis* se tome una azada e inocule un tubo con 3 mL de YEPS e incube por 24 horas a 28° C - 30° C; de este cultivo se tomaron 50 µL e inocularon un segundo tubo con 3 ml de YEPS; incube 12 h bajo las mismas condiciones.

De este último cultivo tome una alícuota de 50 µL de cultivo e inocule con él 20 mL del mismo medio contenido en un matraz de 125 mL; incube 28° C - 30° C en agitación durante 18 horas.

Después de 18 h de incubación y una D.O.₆₀₀ ≈ 1.0 colecte las células de los cultivos por centrifugación (2,000 rpm, 7 min), descarte el sobrenadante y resuspenda las células en 3 mL de buffer SCS (citrato de sodio 20 mM pH=5.8, sorbitol 1M) o CFS (citrato/fosfato 0.2 M sorbitol 1 M pH 5.8) según se requiera, y centrifugue nuevamente 7 min a 2,000 rpm. Resuspenda las células lavadas en 500 µl de buffer y utilizar inmediatamente en la aplicación requerida.

Preparación de bloques con cromosomas embebidos en agarosa. A los protoplastos resuspendidos en 500 µl de SCS o de SFS obtenidos en el paso anterior, agrégueles 800 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% disuelta en EDTA 125 mM, fundida y enfriada, homogenice y vierta la suspensión de protoplastos en los moldes, evitando hacer burbujas.

Deje solidificar los bloquecillos en hielo y desmóldelos en a tubos cónicos Falcon conteniendo 1.5 ml de buffer LET (EDTA 0.5 M, Tris 10 mM pH = 7.0, β2-mercaptoetanol 5 µl) e incube a 30° C por 12 h. Reemplace el LET por 1.5 mL de NDS [0.15M EDTA, 0.01M Tris-HCl pH 8.5, 1% N-lauril sarcosine pH = 9.5, 2 mg/ml proteinasa K, (Sigma Aldrich, Sprouce Street, Saint Louis, USA)] e incube toda la noche a 50°C; descarte el LET y lave los bloquecillos en solución EDTA 100 mM y se almacene a 4°C hasta su uso.

6.6 Electroforesis en gel de campos pulsados

Enjuague los bloques en solución de EDTA 100 mM, y manténgalos sobre hielo; con ayuda de una espátula pequeña coloque los bloquecillos dentro de los pozos de un gel de agarosa 1%, grado ultrapuro o cromosomal fundida en TBE 0.35 X y gelificada en el molde para PFGE. Llene los pozos con el buffer TBE, esto ayudará a no formar burbujas y a deslizarlos suavemente;

Cubra los pozos con agarosa de bajo punto de fusión fundida en 125 mM de EDTA, llene la cámara del CHEF DRII con buffer TBE 0.35 X preenfriado a 10° C hasta cubrir el gel, coloque los electrodos y las condiciones de corrida: 4.5 volts/cm, 14° C, TBE 0.35 X, pulso inicial de 8 seg y un pulso final de 8 seg. El amperaje variará de 73-107 mAmp durante la corrida (Birren & Lai, 1993); el tiempo de corrida puede ser 24 a 36 h, o variar dependiendo de las muestras a analizar.

7. Resultados

7.1 Proceso de infección en plántulas de maíz

Para obtener la progenie de las cepas 521 y PGA 2.1 se realizó la crucea *in planta* utilizando maíz MCS-02 en un ambiente controlado de invernadero, en macetas con suelo esterilizado, a temperatura de 28°C-30°C, riego constante de agua purificada, registro del crecimiento y desarrollo de la planta hasta su cosecha. Las cruza fueron:

518 / 521	Macetas de control positivo
PGA 2.1 / 521	Macetas problema

CRUZA CONTROL 518/521



Figura 2. Proceso de infección en plántulas de maíz de cepas control 518/521

En las imágenes se observa el progreso de la infección. En el día 4 postinfección (DPI) la aparición de clorosis en las hojas es el síntoma inicial; al DPI 6 días la clorosis avanza y en el DPI 8 se observa la agalla que está creciendo en el cuello de la raíz o inicio del tallo. Aunque la clorosis es visible en las hojas, muchas de las veces las agallas se dan en tallos ya que pueden formarse en cualquier parte aérea de la planta. En el DPI 11 empiezan a aparecer las teliosporas en el centro de la imagen como una mancha oscura en el día 13; también se ve la respuesta de la planta a la infección con la aparición de las defensas que tiene, que son las antocianinas. Para los 19 días ya están las plantas a punto de marchitarse, aunque también hay plantas que se inocularon las cuales siguen madurando, por ejemplo, en la foto de los 19 días en donde la planta número 3 apenas inicia con la aparición de teliosporas.

CRUZA PROBLEMA PGA 2.1 / 521



Figura 3. Proceso de infección en plántulas de maíz de cepas de control PGA2.1/521

En las imágenes se registra el progreso de la infección. En el día 4 postinfección (DPI) la aparición de clorosis en las hojas es el síntoma inicial; al DPI 6 días la clorosis avanza y en el DPI 8 se observa la agalla que está creciendo en el cuello de la raíz o inicio del tallo. Aunque la clorosis es visible en las hojas, muchas de las veces las agallas se dan en tallos ya que pueden formarse en cualquier parte aérea de la planta. En el DPI 15 empiezan a aparecer las teliosporas en el centro de la imagen como una mancha oscura; desde el día 6 se ve la respuesta de la planta a la infección con la aparición antocianinas. Para el DPI 19 ya las plantas a punto de marchitarse.

7.2 Porcentajes de infección en plántulas de maíz por *Ustilago maydis*

El porcentaje de infección permite conocer en qué cantidad las plantas se ven infectadas por las cruzas que se están realizando y así empezar a caracterizarlas.

Tabla 3. Porcentajes de infección en plántulas de maíz

Tablas de % de Infección cruzas de 518/ 521						
Días	N° de plantas	Síntomas		Infección		
		Clorosis %	Antocianinas %	Agallas %	Teliosporas %	N° Marchitas
4	33	75.8	3	0	0	0
6	33	69.7	33.3	18.2	0	0
8	33	48.5	60.6	30.3	0	0
11	33	57.6	57.6	30.3	6.1	0
13	33	69.7	57.6	36.4	9.1	0
15	31	32.3	54.8	32.3	29.0	2
19	31	29.0	41.9	32.3	29.0	0

Tablas de % de Infección cruzas de PGA 2.1 / 521						
Días	N° de plantas	Síntomas		Infección		
		Clorosis %	Antocianinas %	Agallas %	Teliosporas %	N° Marchitas
4	39	87.2	0	0	0	0
6	37	83.8	10.8	0	0	2
8	37	73.0	32.4	18.9	0	0
11	37	54.1	45.9	21.6	0	0
13	37	48.6	45.9	24.3	0	0
15	36	0.0	58.3	30.6	5.6	1
19	36	0.0	86.1	30.6	30.6	1

Obtenidas de las bitácoras de seguimiento realizadas durante todo el periodo de la infección hasta el corte de las agallas.

Se dio seguimiento de las infecciones registrando los datos los lunes, miércoles y viernes planta por planta al igual que la toma de fotografías. Se observa que la infección de la cruz con la cepa PGA2.1/ 521 tiene un aumento en la velocidad de la infección ya que en el día 4 el 87.2% de las plántulas presentan clorosis mientras que en 518 /521 el 75.8% de plántulas presentan este síntoma. Sin embargo, en la cruz de 518/521, al día 6 ya presenta la aparición de agallas mientras que en la cruz de PGA 2.1/521 las presenta hasta el día 8. Lo mismo pasa en la aparición de teliosporas la cruz control de 518/521 al día 11 ya tiene la formación visible de teliosporas, en la cruz de PGA2.1/521 tiene la formación de estas hasta el día 15 teniendo 4 días de diferencia. Posiblemente la infección de las cepas silvestres es más efectiva que las de la cruz PGA2.1/521.

7.3 Tumores obtenidos de la cruz de cepas de *Ustilago maydis*

La selección de tumores es importante porque deben de tener una coloración oscura característica de la maduración del tumor, que nos asegura la presencia de teliosporas para su posterior germinación.

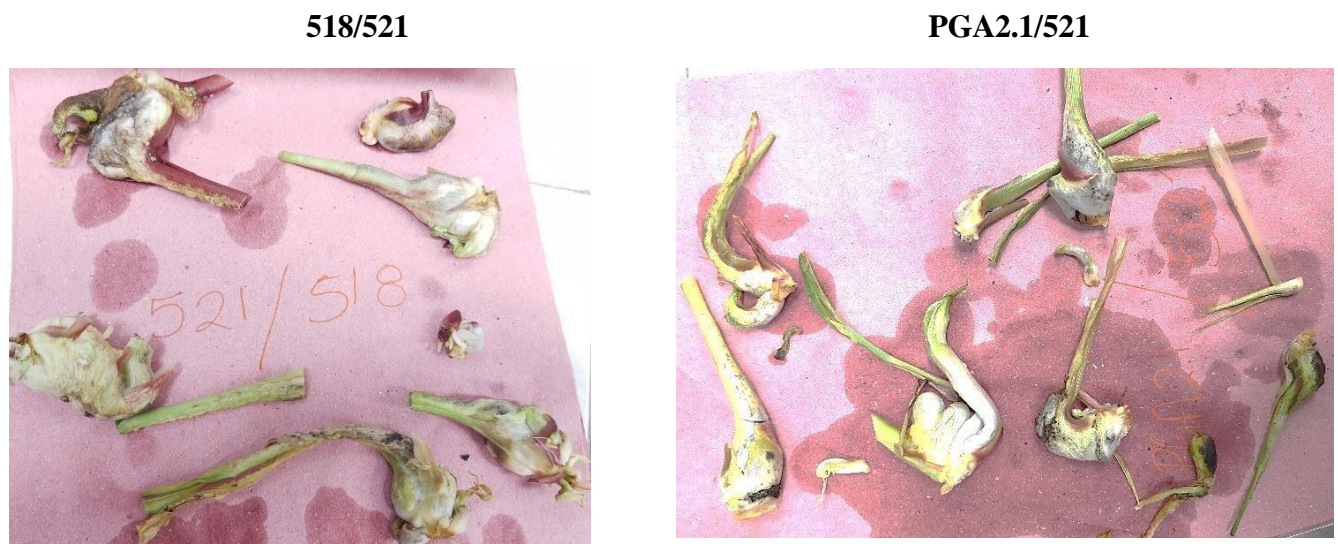


Figura 4. Tumores cosechados en 19 días posteriores a la infección

De todos los tumores que se obtuvieron de las cruces de 518/521 y PGA 2.1/521 solo se cosecharon aquellos que mostraban una coloración oscura característica de una maduración completa de la agalla por una cruz e inoculación eficiente, y se tiene la seguridad de que hay presencia de teliosporas, en la figura 4 en cada una de las cruces realizadas muestran el tamaño, coloración y forma característica de los tumores.

7.4 Porcentaje de germinación de teliosporas de *Ustilago maydis*

Para analizar la viabilidad de las teliosporas se cuantificaron las que fueron capaces de germinar; para ello se espatularon en medio YEPS las cruza problema PGA2.1/521 y se compararon con las cepas control 518/521. Se incubaron a 28°C durante 4 días.

Tabla 4. Promedio de tres repeticiones realizadas en el porcentaje de infección en plántulas de maíz

Cruza	N° de placa /repetición	Promedio de las 3 repeticiones	% de germinación	Promedio del % de germinación
518/521	1	4088	4.1	3.7
	2	2898	2.9	
	3	4121	4.1	
PGA 2.1/521	1	3635	4	4
	2	3971	4.0	
	3	2999	3.0	

Se tomó un tumor diferente para cada extracción, es decir que en la tabla 2 se tomaron 3 tumores para PGA 2.1/521 y 3 tumores para 518/521, las espatulaciones se realizaron el mismo día.

Después de 4 días de crecimiento posterior a la espatulación se pudieron observar las colonias germinadas, obteniendo como resultado que los porcentajes son muy similares, ya que de la cruza de PGA2.1/521 se obtuvo un porcentaje de 4% de germinación contando con una diferencia de 0.3% de la cruza en comparación de 518/521 que germinó 3.7%.

Es decir, la viabilidad de las teliosporas se mantiene.

7.5 Comparación de la morfología colonial en la germinación de teliosporas

Siguiendo con la caracterización de las cruza se deben de comparar las colonias que se obtienen en la germinación ya que con la morfología podemos clasificar las colonias obtenidas y empezar a seleccionarlas logrando obtener colonias únicas.

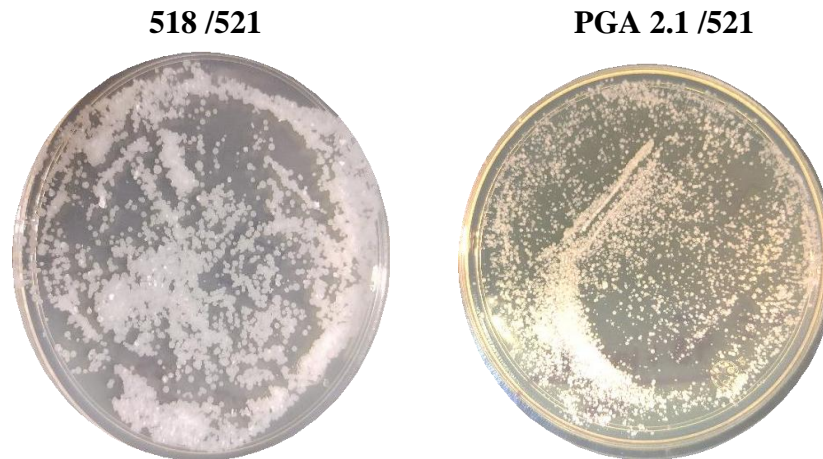


Figura 5. Placas espatuladas con 10.000 teliospora en medio Yeps con 6 días de crecimiento a 28°C

La germinación se realizó por triplicado para poder verificar el porcentaje de germinación y comparar la morfología colonial que presentaba. En la cruza de 518/521 crecieron las colonias características con un tamaño mediano, de forma circular, borde entero y en algunas un poco lobulado, opaca, sin brillo, color beige, textura un poco rugosa, sin elevación y resistencia suave. La mayoría de estas características son parecidas en la cruza de PGA 2.1/ 521 que es diferente solo en el tamaño, siendo pequeño incluso en algunas colonias son puntiformes posiblemente por la diferencia en la cantidad de colonias.

Ambas placas en de la figura 5 tienen 6 días de crecimiento.

7.6 Selección de progenie en placas de carbón activado para obtener colonias de células haploides

Para la selección de la progenie se toma como ventaja la prueba fuz+. Las colonias blancas indicarán que hay más de un tipo de apareamiento compatible en esa unidad formadora de colonia, y por tanto se comporta como una colonia que da un fenotipo fuz+. Para la selección de las colonias que no den fuz+ se parcharon las teliosporas en carbón activado para poner de manifiesto su fenotipo. De las placas que germinaron, se seleccionaron las colonias que estuvieran totalmente aisladas para evitar tomar colonias que al momento de parchar en la plaquita de carbón activado nos diera un fuz+ que es indicativo de que se encuentran dos colonias apareándose que enseguida se deberían descartar, se parcharon 100 colonias por placa para obtener un buen número de colonias viables para las pruebas que seguían. Observamos después de 3 días un mayor número de colonias con el fenotipo fuz+ en las placas de las cepas control que las cepas problema, inicialmente consideramos que hubo un mayor número de colonias únicas obtenidas en la cruce de PGA2.1/521, aunque otras causas, como incapacidad para desarrollar el fenotipo también fue una posibilidad.

Tabla 5. Porcentaje de colonias únicas seleccionadas en placas de carbón activado

Cruza	Placa	Colonias únicas	Promedio	%
518/521	1	14	14	2.72
	2	16		
	3	15		
	4	12		
	5	11		
PGA2.1	1	59	57	11.4
	2	53		
	3	50		
	4	60		
	5	63		

En la tabla se observa la selección de colonias únicas seleccionadas en placas de medio completo con carbón activado, necesaria para la obtención de colonias puras para su posterior análisis.

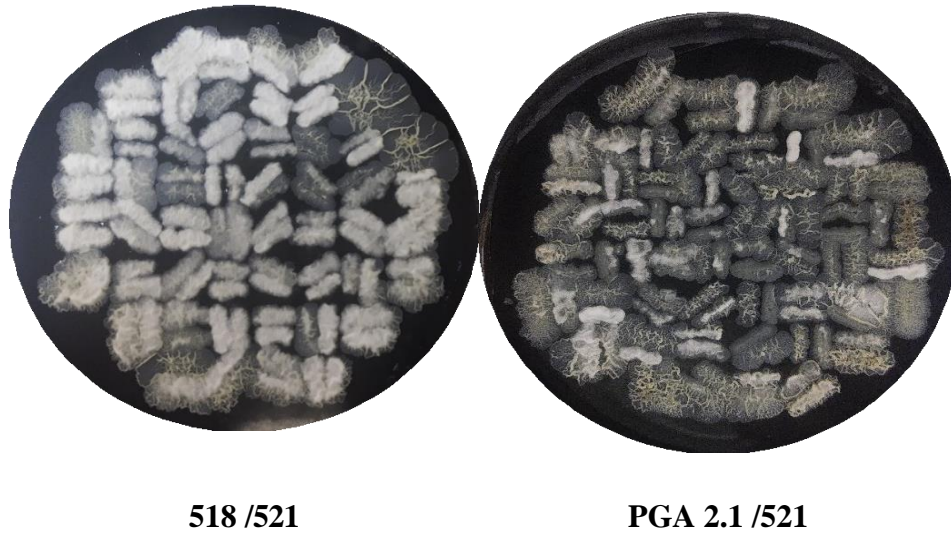


Figura 6. Placas de medio completo con carbón activado. Se muestra la comparación de la capacidad para seleccionar colonias únicas de colonias unidas gracias al color obscuro de la placa, se pueden ver los bordes definidos en cada colonia, aunque pareciera estar juntas

Cada placa contiene 100 colonias cada una en donde se puede observar la presencia de fuz+ como una capa algodonosa por encima del parchado. Del lado izquierdo las cruces de cepas control 518/521 y del derecho las cepas de trabajo PGA2.1/521.

7.7 Determinación del tipo *a* de apareamiento

Las colonias que se seleccionaron mediante las placas de carbón activado pueden ser del tipo de apareamiento *a1* o *a2*, siendo esto que solo pueden cruzarse y dar fenotipo fuz+ las colonias de tipo de apareamiento complementario para dar dicariones *a1/a2*; para determinar el tipo de apareamiento, se procedió a cruzar las cepas con nuestros controles 521 (*a1*, *b1*) y 518 (*a2*, *b2*) aquellas que tengan crucen con células *a1* serán *a2* y viceversa.

Se sembró una asada de las colonias que se seleccionaron las únicas y haploides en una cruz sobre las cepas silvestres 518 y 521 en medio completo con carbón activado que utilizamos como referencia. En la figura 6 se muestran las placas de prueba donde se encuentran sembradas a lo ancho de la caja las cepas 521 y 518, y las clonas de la progenie se encuentran sembradas como líneas verticales que cruzan la cepa de referencia.

Se realizó mediante la técnica de prueba de *fuz*⁺, igualando la concentración de células de todos los cultivos para obtener exitosamente el crecimiento (algodonoso) o el fuz, el crecimiento acelerado de alguna de las cepas impediría que se lograra el reconocimiento complementario de las células y la formación de los túbulos germinales, de los cuales se ve la apariencia Fuz⁺.

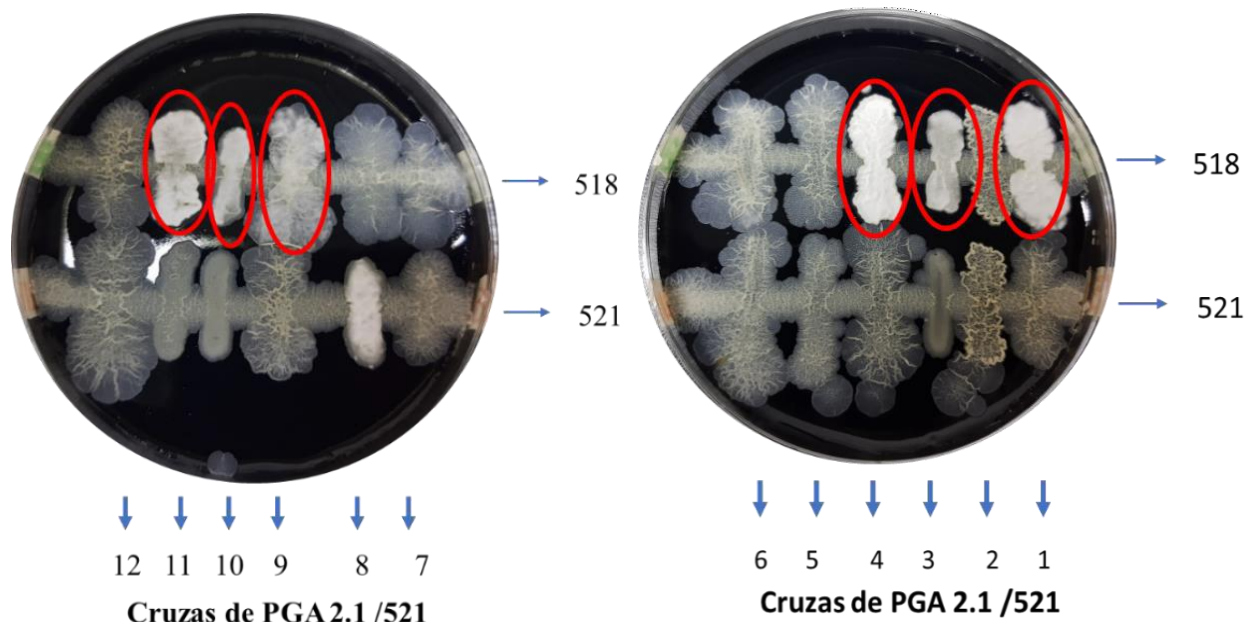


Figura 7. Prueba de *fuz*⁺ para la determinación del tipo de apareamiento, en donde se encierra en un círculo rojo un *fuz*⁺ con 518, que nos muestra que la colonia cruzada es de tipo *a1*

Se puede observar el comportamiento de la progenie obtenida utilizando las cepas de referencia 518 (*a2*, *b2*) y 521 (*a1*, *b1*).

De las cruzas en placa se seleccionó la progenie que con un tipo claro de apareamiento positivo; con 521 era indicativo de que tenía un comportamiento *a2*, *bx* como su complementario 518.

Si la prueba *fuz*⁺ era positiva para ambas cepas control 521 y 518 se descartaba esa cepa progenie ya que no era segura que fuese única esa colonia seleccionada.

7.8 Cariotipo electroforético para el análisis cromosomal de la progenie seleccionada

Para que los cromosomas que se separaron se logren observar nítidos, la preparación de los bloques se debe de realizar de una forma casi perfecta, desde el cultivo, el tiempo acción de la enzima, la concentración de la agarosa y el tipo de esta, además de la programación del CHEF.

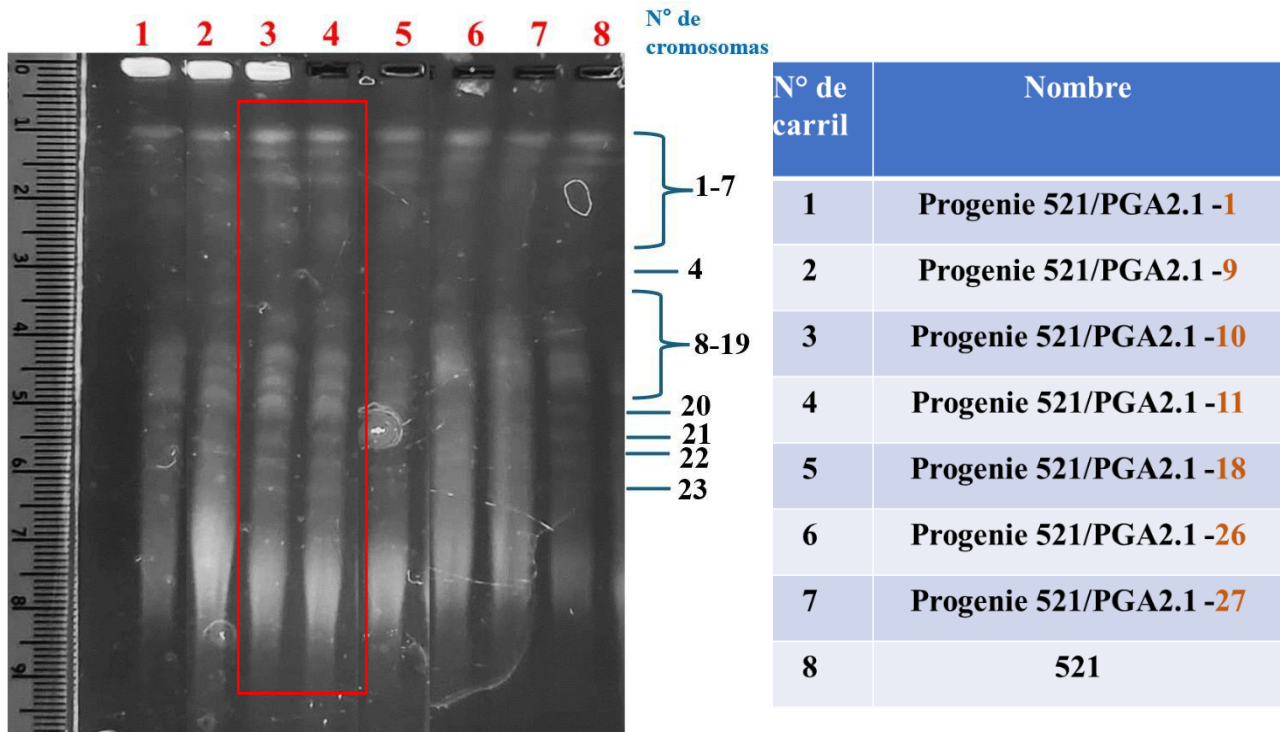


Figura 8. Cariotipo electroforético para analizar la progenie de la cruce de *Ustilago maydis*. Gel de agarosa al 1%, obtenido mediante electroforesis de campo pulsado con DNA cromosomal obtenido con la técnica de elaboración de bloques de agarosa de Kinscherf T. *et al.* 1988 de la progenie seleccionada

Se observa en cada pozo el corrimiento de DNA cromosomal embebido en agarosa, que se llevó a cabo con un pulso de inicio y final 80s por 18h.

En el carril número 8 se encuentra la cepa control en donde se pueden observar las bandas de los cromosomas que se encuentran presentes, las bandas que muestran el peso de los cromosomas parecieran ser similares en la progenie, sin embargo, en comparación con la cepa control 521 (carril 8) solo los carriles 1,2,5,6 y 7 parecieran tener una similitud mayor en los cromosomas del 12-19. La figura 8 es un resultado presuntivo ya que no se logró verificar por triplicado el corrimiento de la progenie que se seleccionó.

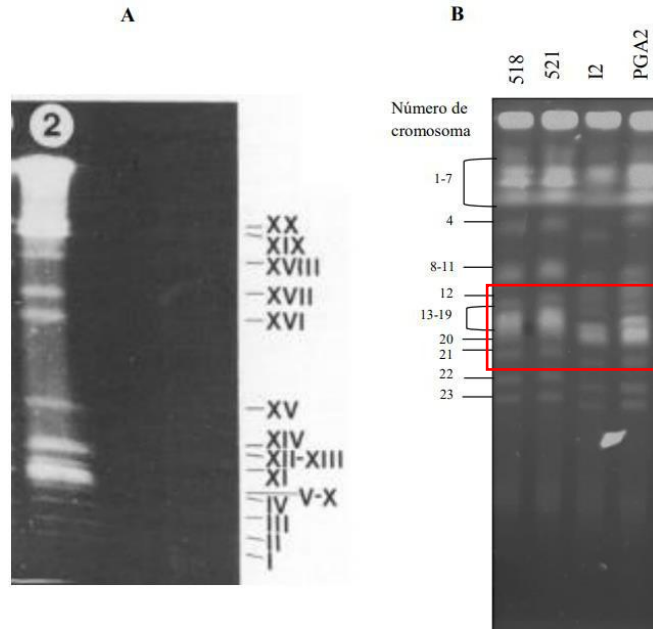


Figura 9. Imágenes de referencia para PFGE: Imagen A obtenida por electroforesis en gel de campos pulsados en un equipo OFAGE de Kinscherf y Leong 1988 con un intervalo de pulso de 70s con TBE 0.5X, agarosa al 1% durante 22h; en la imagen B se observan en los pozos cariotipo de *Ustilago maydis* (cepas 518, 521, I2, PGA2) obtenido en CHEF-DR II BioRad en un corrimiento electroforético a un voltaje de 4.5 V/cm en una corrida de 24 horas a una temperatura de 14°C en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.35x, Foto obtenida del equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular del ICUAP-BUAP.

8. Discusión de resultados

Con respecto a las cruzas en planta y el porcentaje de germinación se obtuvo una clara diferencia, de la cual se observa que la clorosis que es el primer síntoma de infección en la planta la cruz de 518/521 aparece en el DPI 4 al igual que PGA2.1/521 pero el porcentaje es mayor en la segunda cruz, haciéndonos pensar que la formación del apresorio y la infección de la planta es más eficiente para este par de cepas; sin embargo, el desarrollo de la enfermedad total se alcanza primero en la cruz control siendo ésta en el día 6. El porcentaje global de agallas maduras de la cruz problema obtenido durante la infección es de 30.6% y en la cruz de 518/521 es de 36.4%, y además se observa que el tumor del control aparece 4 días antes que el de la cruz de 521/PGA2.1. La maduración de las teliosporas, que es la presencia visible de ellas en el tumor, se da de una forma más rápida en la cruz control siendo ésta en el DPI 11, 4 días antes que la cruz problema iniciando con un porcentaje de 6.1% a 29% en 518/521 y de 5.6% a 30.6% en PGA2.1/521, sin embargo hacen falta estudios estadísticos y moleculares para determinar si hay un comportamiento significativamente diferente; posiblemente la cruz PGA2.1/521 tiene una temporalidad de desarrollo diferente, generando la enfermedad más rápidamente que el par de cepas control.

Cuando se realizó la cosecha y se acondicionaron las agallas en el DPI 19 se apreció la diferencia de tamaño de los tumores en los cuales aquellos pertenecientes a la cruz 518/521 se observaron más grandes, y con una mayor concentración de teliosporas como se puede apreciar en la figura 4.

Descartamos por el momento que la diferencia en el porcentaje de germinación sea un artefacto de observación; también es necesario ajustar los tiempos de exposición al desinfectante o adición de antibióticos a las cajas del medio de germinación. También se encontró que las UFC de la cruz de 518/521 son de un tamaño mayor y al ocupar más espacio dentro de la placa la disponibilidad de nutrientes disminuye así también el área disponible para el crecimiento de las colonias. En la figura 5 se puede observar cómo es que crecieron las colonias de PGA2.1/521 que son puntiformes muy pequeñas y secas dando un mayor espacio para el crecimiento de más UFC.

Es interesante notar que la cruz PGA2.1/521 muestra un aumento en el tiempo necesario para completar la aparición de síntomas, la formación de tumores y la maduración de agallas, podríamos esperar este mismo comportamiento ahora en la germinación dentro del paso 8 y 9 del ciclo de vida. En un futuro se podrían estudiar un número significativo de cruzas que permita determinar

un lapso exacto de tiempo que se requiere para la germinación, y entonces determinar si existe algún factor involucrado en esta diferencia, como por ejemplo el tamaño del genoma, que es más pequeño en la cepa PGA2.1 por la carencia de secuencias moderadamente repetidas en el extremo cromosomal.

Después de las cruza, una vez que se lograron obtener las células haploides, estas se crecieron en “parche” en placas de carbón activado para asegurarnos el obtener colonias haploides aisladas, y no una mezcla que pudiera dar el fenotipo Fuz+, en la figura 6, el crecimiento de los parches en las placas tiene 2 días; se observa un crecimiento mayor en la placa que contiene la cruza de 518/521 que alcanza el crecimiento masivo fuera del inóculo, mientras la cruza PGA2.1/521 crece de una manera más lenta y las clonas permanecen un poco más separadas, la presencia de un mayor número de colonias haploides en la primera puede deberse a las características propias de las cepas, pero también puede ser que hubiera un número mayor de UFC en forma de pares, y esto explicaría porqué la cantidad de cepas cruzadas dando Fuz+ es mayor, esto se puede deber a que en las placas de la germinación de la imagen 5 no se lograron obtener colonias totalmente aisladas. Será necesario en el futuro aislar las clonas germinantes y agitarlas en vortex para analizar otra forma de separar las clonas compatibles.

En el análisis de *fuz*, se observó un aumento de células de tipo de apareamiento *a1*, compatibles con 518, en la figura 7 se muestra que de 12 colonias seleccionadas por lo menos el 50% son de tipo *a1* (*fuz+* positivo con 518), mientras que solo se obtuvo 1 colonia de tipo *a2* (*fuz+* positivo con 521). Esto ha sido reportado previamente (Banuett F, 1981); y no está relacionado con la presencia abundante de *UTASa* en las colonias de tipo *a1* similares a la cepa silvestre 521. Posteriormente se realizará la prueba de *tum+* para verificar la capacidad de infección en planta por compatibilidad del tipo de apareamiento *b* en una segunda cruza, realizada ahora con la progenie obtenida y PGA2.1.

Para el análisis del cariotipo en campo pulsado (PFGE) se realizaron varios ensayos de ajuste de las condiciones de corrida y de tinción del gel para separar de forma clara los cromosomas. En el carril 8 de la figura 8, se muestra el perfil de la cepa control 521, y del carril 1 al 7 el perfil de la progenie que se seleccionó; la cepa de referencia PGA 2.1 no se incluyó en este gel. En las imágenes se muestra que los tres cromosomas más pequeños (carriles 1 al 7) pueden mostrar diferencias en el tamaño, por ejemplo, en los carriles 3 y 4 hay un cambio en el perfil del cariotipo

posiblemente heredados por la cepa PGA2.1 que aparece en la figura 9.B. Un análisis más exhaustivo y cromosomas marcadores de alto peso molecular podrán servir para conocer más exactamente los cambios ocurridos en el tamaño de los cromosomas de la progenie, pues este trabajo estaba orientado a conocer los rasgos generales de los genomas de la progenie de estas cepas.

Las cepas utilizadas en este trabajo son muy valiosas porque presentan esas diferencias en sus extremos cromosomales, y las cruzas son un medio muy eficiente para estudiar en la progenie cómo se transmite la información genética de esta región con alta plasticidad de secuencias, qué características estructurales tendrán, y al alargarse pueden obtener cepas isogénicas que permitan un estudio genético más amplio.

9. Conclusiones

- ✚ Se obtuvo un porcentaje elevado de infección sometiendo a los inóculos de las cepas PGA2.1, 518 y 521 a 18 h de crecimiento, a una D.O. de 10, sin exceder el tiempo de inoculación en la planta de maíz (1 h), lo que aseguró la obtención de la progenie de PGA2.1/521, misma que se comparó con la cruce control de 518/521.
- ✚ Se caracterizaron parcialmente 7 cepas, mediante el conteo de teliosporas, lo que permitió identificar la morfología colonial y obtener al menos 500 colonias únicas. Se seleccionaron aquellas que presentaron el tipo de apareamiento *albx*.
- ✚ Se identificó el cariotipo electroforético de la progenie de *Ustilago maydis* de 7 cepas provenientes de las cruces parentales seleccionadas de PGA2.1 y 521, mediante la adaptación de la técnica de PFGE, en la cual se optimizó el efecto de la enzima *Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum* SIGMA-Aldrich L1412 en el cultivo, lo que promovió la adecuada formación de protoplastos de las cepas analizadas, lo que permitió posteriormente la obtención de DNA de alto peso molecular, y su correcto análisis.
- ✚ Se identificó que 2 de las 7 cepas que se analizaron de la progenie de la cruce de PGA2.1/521 presentaron un cariotipo electroforético parecido a su cepa parental PGA 2.1 y 5 cepas a su parental 521 esto de manera presuntiva, mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado, demostrando la recombinación de los cromosomas de las cepas de las cruces parentales.

10. Referencias

- Arora, R., Brun, C. M., & Azzalin, C. M. (2011). TERRA: Long Noncoding RNA at Eukaryotic Telomeres. *Prog Mol Subcell Biol*, 51, 65-94. doi:10.1007/978-3-642-16502-3_4
- Banuett, F., & Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *PNAS*, 86(15), 5878–5882. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5878>
- Banuett F. (2002). Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. In: Osiewacz HD, editor. *Molecular Biology of Fungal Development*. New York: Marcel Dekker Inc.; pp. 349-398.
- Banuett, F., & Herskowitz, I. (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 37(2), 149–170. [https://doi.org/10.1016/s1087-1845\(02\)00548-0](https://doi.org/10.1016/s1087-1845(02)00548-0)
- Barry, J. D., Ginger, M. L., Burton, P., & McCulloch, R. (2003). Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *International Journal for Parasitology*, 33(1), 29–45. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00247-3](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00247-3)
- Basse, C. W., & Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 5(2), 83–92. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00210.x>
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., & Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 423–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923>
- Biessmann, H., Walter, M. F., & Mason, J. M. (1997). *Drosophila* telomere elongation. *Ciba Found Symp*, 211, 53-67; discussion 67-70. doi: 10.1002/9780470515433.ch5
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(7), 804–804. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00822.x>

Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., & Kämper, J. (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal*, 56(2), 181–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03590.x>

Donaldson, M. E., Meng, S., Gagarinova, A., Babu, M., Lambie, S. C., Swiadek, A. A., & Saville, B. J. (2013). Investigating the *Ustilago maydis/Zea mays* pathosystem: Transcriptional responses and novel functional aspects of a fungal calcineurin regulatory B subunit. *Fungal Genetics and Biology*, 58-59, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.006>

Ekanayake, D. K., Cipriano, M. J., & Sabatini, R. (2007). Telomeric co-localization of the modified base J and contingency genes in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, 35(19), 6367–6377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm693>

Yu, E. Y., Hsu, M., Holloman, W. K., & Lue, N. F. (2017). Contributions of recombination and repair proteins to telomere maintenance in telomerase-positive and negative *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 107(1), 81–93. <https://doi.org/10.1111/mmi.13866>

Eun Sil Yu, Zahid, S. S., Swapna Ganduri, Sutherland, J. H., Hsu, C.-Y., Holloman, W. K., & Lue, N. F. (2020). Structurally distinct telomere-binding proteins in *Ustilago maydis* execute non-overlapping functions in telomere replication, recombination, and protection. 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01505-z>

Fedler, M., Luh, K.-S., Stelter, K., Nieto-Jacobo, F., & Basse, C. W. (2009). The a2 Mating-Type Locus Genes *lga2* and *rga2* Direct Uniparental Mitochondrial DNA (mtDNA) Inheritance and Constrain mtDNA Recombination During Sexual Development of *Ustilago maydis*. *Genetics*, 181(3), 847–860. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.096859>

Flint, J. (1997). Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1305–1313. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1305>

Hansen, K. R. (2006). Evolutionary-conserved telomere-linked helicase genes of fission yeast are repressed by silencing factors, RNAi components and the telomere-binding protein Taz1. *Nucleic Acids Research*, 34(1), 78–88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj415>

Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. In: King RC, editor. *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi: Volume 1*. Boston, MA: Springer. pp. 575-595.

Holloman, W. K., Schirawski, J., & Holliday, R. (2008). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, S31–S39. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.006>

Kalmykova, A. I., & Sokolova, O. A. (2023). Retrotransposons and Telomeres. *Biochemistry. Biokhimiia*, 88(11), 1739-1753. doi:10.1134/s0006297923110068

Khalid Meksem, Shultz, J. L., Faiza Tebbji, Aziz Jamai, Henrich, J., Kranz, H., Arenz, M., Schlueter, T., Ishihara, H., Jyothi, L. N., Zhang, H., & Lightfoot, D. A. (2005). A bacterial artificial chromosome based physical map of the *Ustilago maydis* genome. *48(2)*, 207–216. <https://doi.org/10.1139/g04-099>

Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., & Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: Nonsel-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, 81(1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90372-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90372-0)

Kronstad, J. W. (2008). Mining the genome of the biotrophic fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, S1–S2. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.05.005>

Feldbrügge, M., Kellner, R., & Schipper, K. (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3253–3265. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4777-1>

Louis, E. J., & Haber, J. E. (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *131* (3), 559–574. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.3.559>

Louis, E., Naumova, E. S., Lee, A. T., Naumov, G. I., & Haber, J. (1994). The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics*, *136*(3), 789–802. <https://doi.org/10.1093/genetics/136.3.789>

Mao, N., Zhou, Q., Kojic, M., Pérez-Martín, J., & Holloman, W. K. (2007). Ortholog of BRCA2-interacting protein BCCIP controls morphogenetic responses during DNA replication stress in *Ustilago maydis*. *DNA Repair*, *6*(11), 1651–1660. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.05.012>

Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., & de Vries, R. P. (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, *45*, S63–S70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.012>

Nieto-Jacobo, F., Pasch, D., & Basse, C. W. (2012). The Mitochondrial Dnm1-Like Fission Component Is Required for Iga2 -Induced Mitophagy but Dispensable for Starvation-Induced Mitophagy in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, *11*(9), 1154–1166. <https://doi.org/10.1128/ec.00115-12>

Plinio Guzmán, & Sánchez, J. (1994). *Characterization of telomeric regions from Ustilago maydis*. *Genetics*, *140*(3), 551–557. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-3-551>

Pérez-Martín, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J., & Carbó, N. (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Molecular Genetics and Genomics*, *276*(3), 211–229. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0152-6>

Rehmeyer, C. J., Li, W., Kusaba, M., & Farman, M. L. (2009). The telomere-linked helicase (TLH) gene family in *Magnaporthe oryzae*: revised gene structure reveals a novel TLH-specific protein motif. *Current Genetics*, *55*(3), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0240-3>

Sánchez-Alonso, P., & Guzman, P. (2008). Predicted elements of telomere organization and function in *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, *45*, S54–S62. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.009>

Sánchez-Alonso, P., Lopez, R.L., Vázquez, C.C., & Negrete, A.E., (2018). Capítulo 11. Estado actual de *Ustilago maydis* como modelo para el estudio del metabolismo del DNA. MODELOS MICROBIANOS PARA LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA BIOTECNOLOGIA. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sánchez-Alonso, P., & Guzmán, P. (1998). Organization of Chromosome Ends in *Ustilago maydis*. RecQ-like Helicase Motifs at Telomeric Regions. *Genetics*, *148*(3), 1043–1054. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.3.1043>

Sanchez-Alonso, P., Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O., & Guzman, P. (1996). Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences. *Microbiology*, *142*(10), 2931–2936. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2931>

Wahl, R., Zahiri, A., & Kämper, J. (2010). The *Ustilago maydis* b mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Molecular Microbiology*, *75*(1), 208–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06984.x>

Yee, A. R., & Kronstad, J. W. (1998). *Dual Sets of Chimeric Alleles Identify Specificity Sequences for the bE and bW Mating and Pathogenicity Genes of Ustilago maydis*. *18*(1), 221–232. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.1.221>