



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS



POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“Selección de Mutantes Dobles para los Genes *trt1* y *hda1*, de la Progenie Post Meiótica de Cepas de *Ustilago maydis*, Mutantes para los Mismos Genes”.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN, BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA.**

**PRESENTA:**

IBT. JOSÉ FRANCISCO CRUZ PÉREZ

**TUTOR**

Dra. MA. PATRICIA SÁNCHEZ ALONSO

**PUEBLA, PUE.**

**ABRIL 2016**

*Porque prácticamente todo, las expectativas de los demás, el orgullo, el miedo al ridículo o al fracaso se desvanece frente a la muerte, dejando sólo lo que es verdaderamente importante. Recordar que vas a morir es la mejor forma que conozco de evitar la trampa de pensar que tienes algo que perder. Ya estas desnudo. No hay razón para no seguir tu corazón.*

*Steve Jobs...*

El siguiente trabajo fue realizado en el Instituto de Ciencias Microbiológicas de la BUAP. (CICM, ICUAP), dentro del laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, bajo la dirección de la Dra. Ma. Patricia Georgina Sánchez Alonso, contando con el apoyo de la MC. Estela Anastasio Marcelino y la ayuda de la alumna de licenciatura, Adriana Inclán Popoca.

## **Agradecimientos.**

Agradezco al laboratorio de microbiología molecular y celular por la confianza y el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, a la Dra. Patricia Sánchez Alonso y al Dr. Candelario Vázquez, por haberme recibido en su laboratorio, por sus consejos y orientación a lo largo de este trabajo y principalmente por haberme dado la oportunidad de realizar un proyecto de maestría con ellos. Igualmente agradezco a la MC. Estela Anastasio Marcelino, por su gran apoyo técnico y por su paciencia brindada en cada uno de los experimentos de este trabajo, de igual forma a mis asesores y a la alumna de licenciatura Adriana Inclán Popoca, por su apoyo y gran compañerismo. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por haberme apoyado con una beca, durante la realización de la maestría.

Agradezco a todos mis amigos de la maestría, en especial a: MC. Eduardo Joffre, MC. Martha Minjarez y al QFB. Israel Cervantes; Por ese gran compañerismo mostrado durante este periodo de tiempo, por las experiencias adquiridas a lado de ellos y por los buenos momentos que compartimos. De igual forma agradezco a mis colegas, pero sobre todo amigos IBT's: Alma García, Pablo Velázquez y Antonio Sanpedro por las pláticas tan interesantes y por los consejos tan valiosos brindados, tanto profesionales como personales. A todos los del grupo MIMOCE, son un gran equipo de trabajo y sobre todo buenos amigos, en especial mi compañera de generación MC. Elena Cobos, que siempre estuvimos ahí para apoyarnos a lo largo de este tiempo.

Y por último, pero más importante, quiero agradecer a toda mi familia, que son pilares fundamentales de todo esto, en especial mi mamá, que a cada momento ha estado a mi lado, apoyándome en todas mis decisiones y siempre brindándome un gran consejo, a pesar de ella haber pasado por momentos tan delicados y angustiantes logro salir adelante, dándome una gran lección de vida, mostrándonos las ganas que tiene por vivir. No tengo palabras para agradecer todo lo que ella me ha dado, me enseñó a valorar las cosas que realmente son importantes en esta vida y a confiar siempre en mí. Agradezco a mis hermanos y tíos, por estar a mi lado a cada momento, demostrándome que nada es más importante que la familia, con quien siempre podré contar.

## Índice general.

1.- Resumen .....	1
2.- Introducción .....	2
2.1.- <i>U.maydis</i> . .....	3
2.2.- Telómeros .....	5
2.2.1.- Mantenimiento de los Telómeros .....	6
2.3.- Telomerasa .....	8
2.3.1.- A nivel transcripcional .....	8
2.3.2.- A nivel postranscripcional .....	9
2.3.3.- A nivel epigenético .....	9
2.4.- Histona desacetilasa (HDAC's) .....	9
2.5.- Vías ALT de mantenimiento de los telómeros .....	13
2.6.- Cultivo <i>in vitro</i> de plantas .....	14
2.6.1.- Reguladores de crecimiento .....	15
3.- Antecedentes .....	17
4.- Justificación .....	18
5.- Hipótesis .....	19
6.- Objetivo General .....	20
6.1.- Objetivos particulares .....	20
7.- Materiales y métodos .....	21
7.1.- Extracción de DNA .....	21
7.2.- Purificación de DNA con RNAsa .....	21
7.3.- Extracción de RNA .....	22
7.4.- Limpieza de RNA con DNAsa .....	22

7.5.- Obtención de progenie de <i>U.maydis</i> .....	22
7.6.- Protocolo de infección .....	23
7.7.- Protocolo de desinfección de semillas de maíz .....	23
7.8.- Protocolo de desinfección de explantes .....	23
7.9.- Medio MS (Murashige y Skoog 1962) .....	24
7.10.- Solución hidropónica .....	24
7.11.- Cinéticas de crecimiento .....	24
8.- Resultados y discusión .....	26
8.1.- Objetivo I .....	26
8.2.- Objetivo II .....	29
8.3.- Objetivo III .....	39
8.4.- Objetivo IV .....	43
8.5.- Objetivo V .....	48
9.- Conclusiones .....	59
10.- Perspectivas .....	60
11.- Bibliografía .....	61
12.- Anexos .....	65

## Índice de tablas.

1.- Clasificación de hongos, por los micólogos de hongos asociados a plantas. ....	2
2.- Repetidos teloméricos en hongos .....	6
3.- Clasificación y función de las HDACs .....	10
4.- Efecto de la inhibición o delección de HDAC .....	12
5.- Efecto de la HDAC (rpd3) .....	12
6.- Telotipo en <i>Saccharomyces.cerevisiae</i> .....	13
7.- Loci de apareamiento de las cepas de trabajo .....	26
8.- Cruzas de Trabajo .....	26
9.- Análisis de eventos de haploinsuficiencia .....	27
10.- Porcentajes de infección .....	28
11.- Análisis de infección en dobles mutantes .....	29
12.- Densidad óptica a 600 nm .....	34
13.- Cuenta viable .....	35
14.- Cuenta de celular totales .....	35
15.- Valores de células/ml de UFC .....	38
16.- Valores de "n" .....	38
17.- Tiempos de generación .....	39
18.- Generaciones dobles mutantes .....	40
19.- Días de crecimiento para dobles mutantes .....	40
20.- Diseño de oligos .....	43
21.- Tablas de infección (Micropropagación) .....	48
22.- Nuevas cruzas de trabajo ( <i>in vitro</i> ). ....	53

## Índice de imágenes.

Imagen 1.- Mazorcas de maíz infectadas con <i>U.maydis</i> .....	3
Imagen 2.- Ciclo de vida de <i>U.maydis</i> .....	4
Imagen 3.- Acortamiento de los telómeros .....	6
Imagen 4.- Vías de mantenimiento de los telómeros .....	7
Imagen 5.- Análisis de hibridación Southern blot de los telómeros de TIS y TIIS ....	14
Imagen 6.- Estructura de auxinas .....	16
Imagen 7.- Estructura de citosinas .....	16
Imagen 8.- Patrón TRF de las mutantes parentales .....	17
Imagen 9.- Agallas producto de la infección en planta de maíz .....	27
Imagen 10.- Patrón TRF de mutantes <i>trt-</i> y <i>Δhda1</i> .....	29
Imagen 11.- Agallas de dobles mutantes .....	30
Imagen 12.- Dobles mutantes .....	31
Imagen 13.- Dobles mutantes seleccionadas .....	31
Imagen 14.- Comprobación de la interrupción de <i>hda1</i> en las dobles mutantes ....	32
Imagen 15.- Comprobación de la interrupción de <i>trt1</i> en las dobles mutantes .....	33
Imagen 16.- Estructura telomérica en <i>U.maydis</i> .....	40
Imagen 17.- Autoradiografías de las dobles mutantes .....	41
Imagen 18.- Autoradiografías de las dobles mutantes con las cepas WT y parentales .....	42
Imagen 19.- Comprobación de la especificidad de amplificación .....	44
Imagen 20.- Extracción de RNA de las WT .....	44
Imagen 21.- PCR de diluciones de cDNA con oligonucleótidos específicos de actina .....	45

Imagen 22.- PCR de diluciones de cDNA con oligos específicos para <i>Ku70</i> , <i>Rad51</i> y <i>Rad52</i> .....	46
Imagen 23.- Macetas con plantas infectadas en el invernadero .....	49
Imagen 24.- Explantes desinfectados, sembrados en medio MS .....	49
Imagen 25.- Explantes en medio MS, cubierto por el crecimiento de algún microorganismo .....	50
Imagen 26.- Explantes en medio MS con ( <i>Hyg</i> ) .....	50
Imagen 27.- Imágenes tomadas al microscopio, del crecimiento presente alrededor y encima de los explantes .....	51
Imagen 28.- Semillas de maíz sembradas en medio agar-agua .....	52
Imagen 29.- Plántulas de maíz, para infección en sistema hidropónico .....	53
Imagen 30.- Hojas de maíz, con formación de agallas, sembradas en medio MS ...	53
Imagen 31.- Semillas de maíz sembradas en medio agar-agua .....	54
Imagen 32.- Semillas de maíz germinadas en medio agar-agua .....	54
Imagen 33.- Plántulas de maíz, listas para la infección con <i>U.maydis</i> en un sistema in vitro .....	54
Imagen 34.- Agallas formadas en sistema <i>in vitro</i> .....	55
Imagen 35.- Explantes sembrados en medio MS .....	56
Imagen 36.- Desarrollo de explantes .....	57
Imagen 37.- Desarrollo de brotes junto con el hongo en los explantes .....	58
Imagen 38.- Esporidias observadas al microscopio de la cruz 521xTrt1-53 .....	59

## Índice de gráficas.

Grafica 1.- Cinéticas de crecimiento respecto a la DO a 600 nm .....	34
Grafica 2.- Cinéticas de crecimiento determinando la cuenta viable (UFC /ml) .....	35
Grafica 3.- Cinéticas de crecimiento respecto a conteo en cámara de Neubauer (células/ml) .....	36
Grafica 4.- Relación conteo UFC / Conteo células totales de 521 .....	36
Grafica 5.- Relación conteo UFC / Conteo células totales de 518 .....	36
Grafica 6.- Relación conteo UFC / Conteo células totales de (MHT534).....	37
Grafica 7.- Relación conteo UFC / Conteo células totales de (MHT531) .....	37

## 1.- Resumen.

Los telómeros, son estructuras nucleoproteicas que se localizan al extremo de los cromosomas eucariontes. Su función es proteger a los extremos cromosomales, evitando la degradación y la fusión cromosómica. Están constituidos por secuencias cortas repetidas, ricas en G+C, dispuestas en tándem, y terminan en un tramo de secuencia de cadena sencilla 3' OH. Existen dos vías encargadas del mantenimiento de los telómeros. La vía de transcripción reversa (telomerasa, retrotransposones de extremo cromosomal) y las vías alternativas (basadas en recombinación). En la primera, interviene la telomerasa, un complejo enzimático ribonucleoproteico con actividad de transcriptasa reversa, compuesto por una subunidad catalítica proteica (TERT) y un componente de RNA que sirve de molde para la retrotranscripción (TER). La expresión transcripcional de TERT se encuentra regulada a niveles transcripcionales, postranscripcionales y epigenéticos, y es un factor limitante para la actividad de la enzima. Para las vías alternativas (ALT) intervienen al menos una treintena de genes involucrados en varios aspectos del metabolismo primario de los ácidos nucleicos, y se desconoce mucho de su regulación. La HDACs juegan un papel importante en la descompactación de la cromatina y la expresión de algunos genes involucrados en el desarrollo. En diferentes organismos, la delección de las HDACs tienen un efecto sobre la expresión de genes de contingencia localizados en las cercanías del telómero, y en *Ustilago maydis* la delección de *hda1* provoca la desrepresión de genes exclusivos de la fase micelial. En nuestro laboratorio, se han logrado obtener mutantes de *U.maydis*  $\Delta hda1$  y *trt1::hph*. Ambas son afectadas en el patrón del fragmento terminal de restricción (TRF); con el fin analizar el impacto de la delección de *hda1* en mutantes *trt*-, en este trabajo se propuso obtener dobles mutantes para ambos genes y esclarecer el impacto de estas en el patrón de TRF, y contribuir al esclarecimiento de los mecanismos de alargamiento del telómero por las vías ALT, así también se realizaron investigaciones, para el desarrollo de cultivos *in vitro* de tejido de planta maíz, infectadas con *U.maydis*.

## 2.- Introducción.

El estudio de la microbiología, es sin duda uno de los aspectos de mayor relevancia en nuestros tiempos. Numerosas investigaciones se han realizado a lo largo de la última década, dando como resultado, una enorme cantidad de conocimientos acerca de los microorganismos con los que convivimos diariamente y que están presentes en prácticamente todo lo que nos rodea. Gracias al estudio de estos, se han logrado importantes avances en numerosos campos, como la medicina, la agronomía, la industria alimentaria, la industria farmacéutica; entre otros. Por tanto el estudio del mundo microbiano es de vital importancia para la vida futura de la humanidad.

Dentro de la amplia gama de microorganismos, se encuentran los hongos, organismos eucariontes que han tomado un papel muy importante en nuestra vida diaria. Nombrando algunos de los más importantes en la tabla 1, entre los que se encuentra *Ustilago maydis*, el organismo del presente trabajo de investigación (Dean *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Clasificación de los hongos según lo votado por los micólogos de hongos asociados a plantas, para la revista Molecular Plant Pathology 2012 (1) Ralph Dean, (2) Jan a. L. Van Kan, (3) Zacharias A. Pretorius, (4) Kim E. Hammond-Kosack, (5) Antonio di Pietro, (6) Pietro D. Spanu, (7) Jason J. Rudd, (8) Marty Dickman, (9) Regine Kahmann, (10) Jeff Ellis.

Ranking	Hongo	Autor o descripción del hongo
1	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Ralph Dean
2	<i>Botrytis cinera</i>	Jan A,L. van Kan
3	<i>Puccinia spp</i>	Zacharias A. Pretorius
4	<i>Fusarium graminearum</i>	Kim Hammond-Kosack
5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Antonio Di Pietro
6	<i>Blumeria graminis</i>	Pietro Spanu
7	<i>Mycosphaerella graminicol</i>	Jason J.Rudd
8	<i>Colletotrichum spp</i>	Marty Dickman
9	<i>Ustilago maydis</i>	Regine Kahmann
10	<i>Melampsora lini</i>	Jeff Ellis

## 2.1.- *U.maydis*.

El “huitlacoche” (carbón común) es una enfermedad específica del maíz (*Zea mays*) y de su probable antecesor evolutivo, el teozintle (*Zea mays ssp. parviglumis*; del náhuatl teocintli, “grano de los dioses”, nombre aplicado a diversas especies del género *Zea* nativos de Mesoamérica), la enfermedad se caracteriza principalmente por el desarrollo de tumores o agallas en las mazorcas (Ruiz-Herrera 2008).

*U.maydis* es un hongo basidiomiceto dimórfico facultativo, pertenece al grupo de los Ustilaginales, los cuales constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 120 especies, que infectan a 4000 especies de plantas monocotiledóneas divididas en 75 familias en todo el mundo. *U. maydis* infecta a *Zea mays*, principalmente (Kronstad 2008). Los primeros trabajos en este hongo, fueron realizados por Christensen y Stackman en 1930 a 1950 (Ciclo de vida y fisiología). En México, uno de los primeros investigadores, en trabajar con *U. maydis*, como modelo de estudio, fue Ruíz-Herrera en 1996.

Entre las especies de Ustilaginales fitopatógenos podemos citar a *Ustilago hordei* (carbón cubierto) y *U. nuda* (carbón volador), que infectan a la cebada, y *U. nigra* (carbón volador negro) de la avena. Entre los patógenos del trigo se puede citar a *Tilletia indica* (carbón parcial), *T. caries* y *T. controversa* (carbones hediondo y causantes de enanismo). *T. scitaminea* es un importante patógeno de la caña de azúcar (Ruíz-Herrera 2008).

**Imagen 1.** Mazorcas de maíz, infectadas con *U.maydis*.

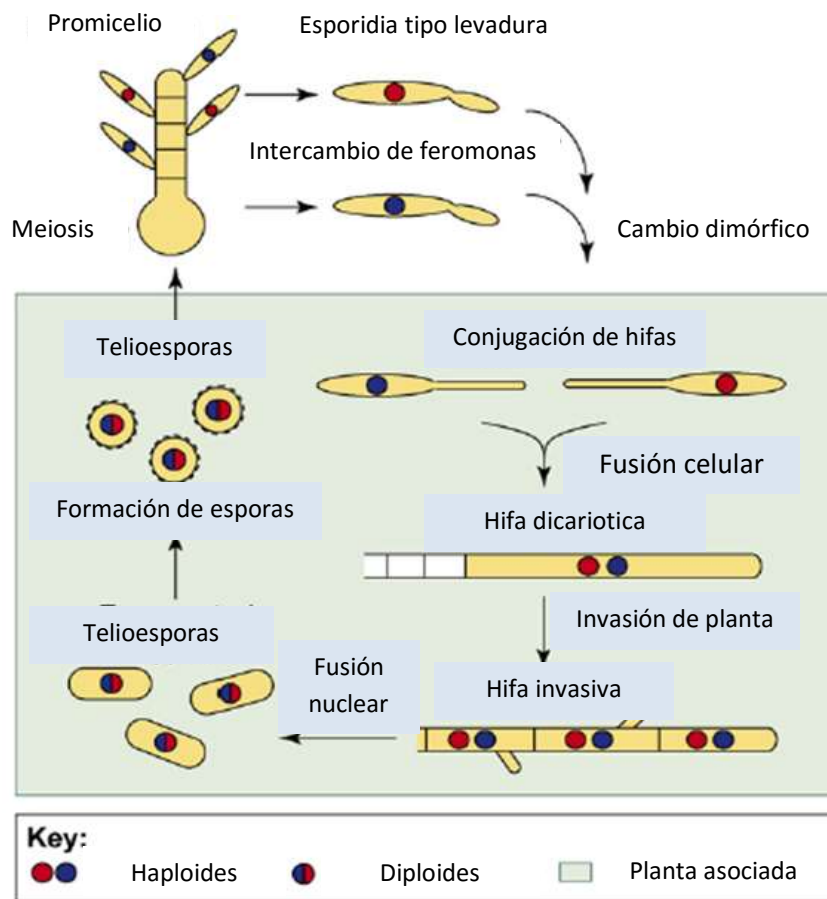


El ciclo de vida de *U.maydis*, está constituido en varias etapas. Las células haploides se reconocen entre sí mediante un sistema de feromonas, este gradiente de feromonas orienta el desarrollo de tubos de conjugación de estas células, para que pueda llevarse a cabo el apareamiento por medio de la plasmogamia, ocurre la fusión de células haploides, el brote de la forma dicariótica, formación de hifas, y la proliferación de estas hifas en la superficie. La segunda consiste en la invasión de las hifas hacia el hospedero y la proliferación del hongo entre las células del hospedero. La tercera etapa provoca la alteración del control de crecimiento del hospedero y la inducción de formación de tumores. En la cuarta hay producción de material mucilaginoso, cariogamia, fragmentación de la hifa y la célula comienza a tomar una forma redonda; existe reorganización de la maquinaria para el crecimiento polarizado y la secreción. En la quinta

etapa se presenta la deposición, de una pared celular especializada y comienza la producción de telioesporas maduras. Y por último, en la sexta etapa ocurre la germinación de las telioesporas, meiosis, y la generación de la forma haploide (Banuett, 2002), (Banuett y Herskowitz 2002).

A continuación se muestra el esquema del ciclo de vida de *U. maydis*

**Imagen 2.** Ciclo de vida de *U. maydis* (Steinberg *et al.*, 2007).



Sin duda alguna, *U. maydis* es un modelo de estudio muy completo y sobre todo muy fácil de manejar, algunas características del modelo, se mencionan a continuación.

- Tiene una fase unicelular haploide con un corto tiempo de generación 120 minutos en un medio rico, comparado con *S. cerevisiae* (90 min), y *S. pombe* (120 min). La forma unicelular crece bien en medios líquidos en un amplio rango de temperaturas, de hasta ~35 °C

- El tamaño pequeño del genoma haploide de *U. maydis*, de ~20 Mb, hace posible la secuenciación entera del genoma en poco tiempo, el cual está organizado en 23 cromosomas y contiene 6522 genes.
- La existencia de varios marcadores de selección, hace posible y fácil la introducción de múltiples interrupciones dentro de la misma célula. Estos marcadores son phleomycina (*ble*), hygromicina (*hyg*), carboxin (*cbx*), y noursectricina (*nat*). El remplazamiento de genes por recombinación homóloga puede ocurrir con una frecuencia de 20–65%.
- La existencia de meiosis, permite el análisis de la segregación y la generación de dobles y triples mutantes por medio de cruza.
- Puede completar su ciclo de vida en cualquier parte de la planta, puede ser completado en 2–3 semanas.
- Presenta telómeros cuyo motivo repetido (TTAGGG)<sub>n</sub> es similar al de otros hongos filamentosos y al de mamíferos, entre ellos el humano (Banuett, 2002, Sánchez Alonso 1997).

El último punto de la lista anterior, es de mayor relevancia para este trabajo, ya que se abordan temas relacionados con el telómero y su estructura.

## 2.2.- Telómeros.

Los telómeros son estructuras formadas principalmente por DNA y proteínas, que se localizan en los extremos de los cromosomas eucariontes, para protegerlos de la degradación y fusión cromosómica, manteniendo así la estabilidad del genoma (Blackburn *et al.*, 1984). Están constituidos por secuencias repetidas de nucleótidos, arregladas en tándem de DNA, las cuales no son genes ni secuencias codificantes (Blackburn, 2001). El DNA telomérico en células de mamíferos, presenta repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG (Palm *et al.*, 2008). Este tipo de repetido se encuentra en *U. maydis* y en general en los hongos filamentosos (Podlevsky, 2008). Los telómeros están implicados en varias funciones celulares importantes como la estabilidad cromosómica y funciona como parte del reloj biológico que determina la extensión de vida celular (Blackburn, 2001). El telómero debe mantener una secuencia promedio y esto es posible en la mayoría de los organismos por la actividad de la telomerasa y una red de proteínas asociadas a los telómeros. En *U. maydis* la longitud promedio de los telómeros es de 200 a 350 pb, presentan dos conformaciones UTASa y UTASb. En la siguiente tabla, se muestran algunos repetidos teloméricos de algunos organismos.

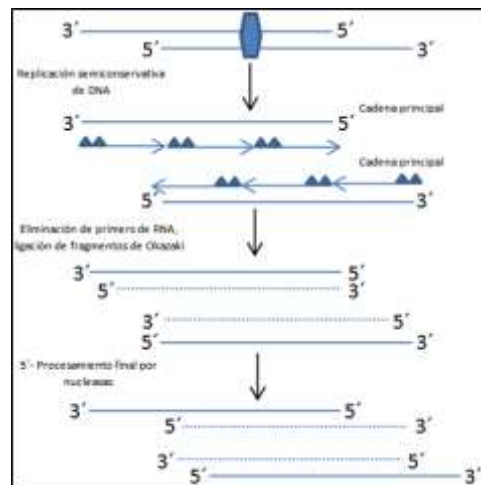
**Tabla 2.** Repetidos teloméricos en hongos (Sánchez Alonso P. 2008 (a) Bhattacharyya y Blackburn (1997), (b) Underwood *et al.* (1996), (c) Inglis *et al.* (2005), (d) Farman y Leong (1995), (e) Schechtman (1990), (f) Coleman *et al.* (1993), (g) Hijri *et al.* (2007), (h) Padmavathi *et al.* (2003), (i) Levis *et al.* (1997) y Long *et al.* (1998), (j) Levis., *et al.* (1997), (k) Powell and Kistler (1990), (l) Guzman y Sanchez (1994), (m) Shampay *et al.* (1984), (n) Matsumoto *et al.* (1987), (o) McEachern y Blackburn (1995) y McEachern and Hicks (1993), (p) McEachern y Hicks (1993), (q) Kusumoto *et al.* (2003)).

Organismo	Repetido Telomérico	Referencia
<i>Aspergillus nidulans</i>	TTAGGG	a
<i>Pneumocystis carinii</i>	TTAGGG	b
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	TTAGGG	c
<i>Magnaporthe grisea</i>	TTAGGG	d
<i>Neurospora crassa</i>	TTAGGG	e
<i>Cladosporium fulvum</i>	TTAGGG	f
<i>Glomus intraradices</i>	TTAGGG	g
<i>Beauveria bassiana</i>	TTAGGG	h
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	TTAGGG	i
<i>Botrytis cinérea</i>	TTAGGG	j
<i>Fusarium oxysporum</i>	TTAGGG	k
<i>Ustilago maydis</i>	TTAGGG	l
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	TG <sub>1-3</sub>	m
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTA(A)(C)G(1-8)	n
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GGTGTACGGATTT GATTAGGTATGT	o
<i>Candida albicans</i>	GGTGTACGGATGT CTAACCTCTT	p
<i>Aspergillus oryzae</i>	TTAGGGTCAACA	q

### 2.2.1.- Mantenimiento de Telómeros.

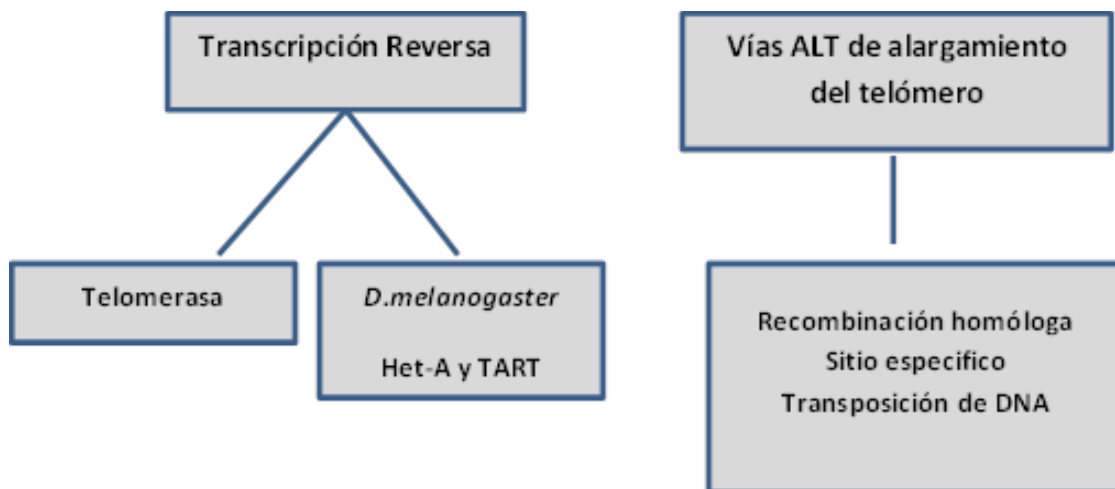
El número de divisiones que la célula puede experimentar, se correlaciona con la longitud de los telómeros (Counter 1996). Esto derivado del propio proceso de replicación del DNA, debido que no es capaz de replicar completamente los extremos cromosómicos. Como resultado, los telómeros se acortan en cada ronda de división celular por replicación incompleta o por resección de la cadena 5' terminal. En la siguiente imagen, se esquematiza el fenómeno de acortamiento de los telómeros.

**Imagen 3.** Acortamiento de los telómeros, debido a los proceso de replicación celular (Blackburn *et al.*, 1984)



Existen dos vías encargadas del mantenimiento de los telómeros. La vía de transcripción reversa y las vías alternativas basadas en recombinación. En la mayoría de los organismos eucariontes, el principal mecanismo de mantenimiento de la longitud del telómero, es la transcripción reversa, llevada a cabo por la telomerasa (Greider, *et al.*, 1987), otra forma de transcripción reversa para mantener la longitud de la secuencia terminal de los cromosomas, es la retrotransposición de los elementos HetA y TART al final físico de los cromosomas de *Drosophila melanogaster*. La telomerasa por su parte sintetiza el extremo cromosómico 3'-OH terminal, mientras que la cadena complementaria es sintetizada por la DNA polimerasa convencional (Zvereva *et al.*, 2010). La telomerasa es un complejo enzimático ribonucleoproteico, tiene como componentes centrales una subunidad proteica con actividad de transcriptasa reversa, o subunidad catalítica, y un componente de RNA telomerásico, el cual contiene el molde para la síntesis de repetidos teloméricos. La expresión de TERT se encuentra regulada a niveles transcripcionales, postranscripcionales y epigenéticos (Zvereva *et al.*, 2010). Por otra parte, las vías alternativas (ALT) están basadas en eventos recombinatorios; también son moduladas por la descondensación de la cromatina de las regiones regulatorias de los genes involucrados en los procesos recombinacionales de ALT (Yang *et al.*, 2013). La delección de algunas HDACs, genera la descompactación de la cromatina y la expresión de algunos genes de la región subteloamérica. En el siguiente esquema, se muestran las vías conocidas de mantenimiento de los telómeros.

**Imagen 4.** Vías de mantenimiento de los telómeros.



### **2.3.- Telómero terminal transferasa (Telomerasa).**

La telomerasa es esencial para el mantenimiento de la longitud del telómero y de la capacidad replicativa de células troncales y pluripotenciales, y está involucrada en el desarrollo de cáncer. La expresión de las dos subunidades centrales de la enzima (TERT y TR) se encuentra muy fuertemente regulada durante el ciclo celular y durante el ciclo de vida de los eucariotas. Otros componentes proteínicos esenciales adicionales incluyen EST1A y EST1B, así como disquerina en mamíferos, y Est1, Est3 y Sm7 en *S.cerevisiae* (Hug y Lingner 2006). La subunidad TERT contiene al menos cuatro dominios. El primero es el dominio central, correspondiente al de la transcriptasa reversa (RT), formado por siete motivos conservados (1,2,A,B,C,D,E), los cuales catalizan la síntesis de la cadena rica en G', el segundo dominio es de unión al RNA, comprende tres motivos conservados; CP, QFP, y TS, es necesario para la unión específica de TERT, el tercer dominio es el de N-terminal, que puede tener una región conservada conocida como GQ, la cual es necesaria para la actividad *in vivo*. Y el último dominio corresponde al C-terminal, el cual está involucrado en la procesividad y el reclutamiento de la telomerasa en los telómeros (Zvereva *et al.*, 2010). La subunidad de RNA o TR presenta tres dominios conservados, el dominio pseudonudo/molde, el dominio CR4/CR5 y una caja de dominio H/ACA (Wyatt *et al.*, 2010).

En humano, la expresión de TERT, se encuentra fuertemente regulada en niveles transcripcionales, postranscripcionales y epigenéticos (Zvereva, *et al.*, 2010), algunos de los cuales se mencionan a continuación.

#### **2.3.1.- A nivel transcripcional.**

En mamíferos, se sabe que una cantidad de factores involucrados en el control de la proliferación celular, y en la regulación génica durante el desarrollo, se unen a la región del promotor de TERT; entre estos factores encontramos c-Myc, Ap2, Sp1, Sp3, HIF-1, ER81, Ets, p53 y Wt1 (Kyo *et al.*, 2008). Especialmente importante es la participación de c-Myc, un factor transcripcional que interactúa con más del 10% de los promotores de humano. Myc es un regulador global, que controla genes involucrados en crecimiento y división celular, la progresión del ciclo celular, la diferenciación celular y la apoptosis. Este regulador actúa en forma de heterodímero c-Myc/Max, el cual presenta afinidad por las cajas E (E-boxes), las cuales se encuentran en las regiones promotoras de genes de la eucromatina, entre ellos de hTERT; esta afinidad es mayor cuando la cromatina se encuentra modificada como H3K4Me2, H3K4Me3, H3K9Me2, H3K9ac, H3K18ac y H3K27ac (Wahlström, 2013). Recientemente se ha determinado que tanto la cantidad de las marcas sobre la cromatina como la actividad transcripcional de hTERT aumentan cuando c-

Myc/Max se une a las cajas E-box, poniendo en relieve el control que ejercen éstos factores transcripcionales sobre la transcripción de hTERT (Wahlström, 2013).

### **2.3.2.- A nivel postranscripcional.**

La regulación de hTERT también se efectúa durante el proceso de maduración del transcrito, por empalme alternativo de exones (Ulaner 1998; Ulaner 2001). El gen que codifica para hTERT tiene 16 exones, los cuales dan origen a un transcrito maduro funcional únicamente cuando contiene todos los exones, pero también da origen a múltiples variantes o isoformas por empalme alternativo de algunos de éstos exones, cuyas funciones actualmente están siendo elucidadas (Killian *et al.*, 1997). El empalme alternativo se propuso como una forma de regulación de la actividad de la telomerasa, debido al hallazgo de isoformas relacionadas con el tipo de tejido, la edad gestacional y el desarrollo del humano (Ulaner, 1998).

### **2.3.3.- A nivel epigenético.**

Respecto a la regulación de la subunidad catalítica por rutas epigenéticas, esta es aun complicada, debido a la cantidad de modificaciones que puede sufrir tanto el DNA como las colas de las histonas de la cromatina.

## **2.4.- Histona Desacetilasas (HDACs).**

Las (HDAC) son enzimas que eliminan los grupos acetilos de los residuos de lisina localizados en los extremos N-terminales, de las proteínas histonas. Otros de los sustratos de estas enzimas son proteínas diferentes de histonas que incluyen factores y reguladores de transcripción, mediadores de la transducción de señal, enzimas de reparación del DNA, reguladores de importe nuclear, proteínas chaperonas, proteínas estructurales, mediadores de inflamación y proteínas virales (Brosch *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Marks and Xu 2009). Se conoce que en humano la activación anormal de las HDACs conduce a la iniciación y promoción del cáncer, posiblemente por la desregulación de genes involucrados en procesos esenciales de crecimiento y proliferación celular (Witt *et al.*, 2008). Las HDACs se agrupan en 4 clases: I, II, III y IV. Esta clasificación está basada en su identidad de secuencias respecto a sus ortólogos en levaduras Rpd3, Hda1 y Sir2 respectivamente (Ruijter *et al.*, 2003; Gregorette *et al.*, 2004). Las clases I, II y IV son conocidas como HDAC clásicas y comprenden 11 miembros de la familia en humanos. Mientras que los miembros de la clase III, son nombrados sirtuinas (Gregorette *et al.*, 2004). Las HDAC clásicas y sirtuinas difieren en sus mecanismos catalíticos. Las HDACs clásicas son enzimas dependientes de  $Zn^{2+}$  las cuales contienen en un compartimiento en su base catalítica iones de  $Zn^{2+}$ . Estas enzimas puede ser inhibidas por la presencia de algún agente quelante, como los ácidos hidroxámicos (Witt *et al.*, 2008). En contraste en

la clase III, las sirtuinas, los agentes quelantes no son activos en ellas, debido a que estas presentan un mecanismo de acción diferente, que requiere NAD<sup>+</sup> como cofactor esencial (Ruijter *et al.*, 2003). En la tabla 3 se muestra la clasificación de HDAC.

**Tabla 3.** Clasificación y función de las HDACs. Abreviaciones: MEFs- Fibroblastos de embriones de ratón; N- Nuclear; C- Citoplasmático; N/C, Nuclear y citoplasmático; nd- no determinado (Ruijter, et al. 2003; Gregoretti, et al. 2004).

	Miembros de la familia HDAC		Substratos	Parejas de unión	Expresión tisular
<b>Clase I</b>	HDAC1	N	P53, MyoD, E2F-1, Stat3 androgeno.	Sin3, Mi2/NuRD, CoR, EST	Ubicuo
			Bcl-6, Stat3, receptor glucocorticoid, YY-1		
	HDAC2	N		Sin3, Mi2/NuRD, CoR, EST	Ubicuo
			GATA1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP		
	HDAC3	N	nd	N-CoR/SMRT	Ubicuo
	HDAC8	N/C		EST1B	Ubicuo
<b>Clase II A</b>	HDAC4	N/C	GCMa, GATA-1, HP-1	ANKRA, RFXANK	Corazón, musculo liso y cerebro
					Corazón, musculo liso y cerebro
	HDAC5	N/C	Smad-7, HP-1, GCMa	REA, receptor de estrógeno	Corazón, placenta, musculo liso y páncreas.
				HIF1a, Bcl-6	Musculo liso y cerebro
	HDAC7	N/C	FLAG 1 y 2		
	HDAC9	N/C	nd	FOX3P	
<b>Clase II B</b>	HDAC6	C	A-Tubulina, HSP90, SHP, Smad7	nd	Riñón, Hígado, corazón, páncreas
					Bazo, riñón, hígado.
			HSP90?		
	HDAC10	C		nd	
<b>Clase IV</b>	HDAC11	N/C	nd	HDAC6?	Corazón, musculo liso, riñón, bazo.

Las HDACs son proteínas altamente conservadas, ya que éstas enzimas provenientes de humano, de *Arabidopsis thaliana* y de levaduras, presentan aproximadamente un 50-70% de similitud en las secuencias de aminoácidos (González, *et al.*, 2004). Las HDACs mejor estudiadas en humano son las HDACs clase I y II cuyas contrapartes en eucariontes inferiores pueden incluir RPD3-like I y la clase HDAC1 Like II.

Las modificaciones epigenéticas en la cromatina y en el DNA tienen un profundo efecto en el control de la regulación génica y en el mantenimiento de la región telomérica, con un efecto sobre el control de la subunidad catalítica de la telomerasa que es dependiente de la línea celular. La inhibición de histona deacetilasas, por fármacos en células humanas, afecta de manera no selectiva a las distintas clases de histona deacetilasas, así como los efectos de los inhibidores de histona deacetilasa afectan la transcripción de hTERT. En células normales y cancerosas, los inhibidores de HDACs conducen a respuestas diferentes dependiendo de la línea celular, por ejemplo: en células normales la inhibición de las histona deacetilasa por tricostatina resulta en la activación de la telomerasa y un aumento en la abundancia de transcritos de hTERT, resultando en el alargamiento del telómero (Cong y Bacchetti, 2000). Este aumento en la transcripción de hTERT puede estar regulado a través de la remodelación de la cromatina por la acetilación reversible de las colas de histona.

En algunas líneas celulares cancerosas la activación de las HDACs a su vez activa transcripcionalmente a hTERT e incrementa la actividad de la telomerasa durante la inmortalización celular. En las células cancerosas que son telomerasa-negativas, la inhibición de las histona deacetilasas conduce al mantenimiento de la longitud del telómero por la vía ALT, debido a la descondensación de la cromatina de las regiones regulatorias de los genes involucrados en los procesos recombinacionales involucrados en ALT. Esta vía de mantenimiento de la longitud del telómero se cree compite con la vía de la telomerasa cuando en condiciones normales se descondensa la cromatina, dando como resultado un aumento en la longitud de los telómeros (Jung, 2013).

Por otra parte, en cerdos clonados, el tratamiento de los blastocitos con el inhibidor de HDACs tricostanina, permite el alargamiento de los telómeros de los cromosomas en los núcleos somáticos transferidos, corrigiendo el acortamiento de los telómeros que persiste en los cromosomas de mamíferos clonados (Xie, 2012). Una clase de HDAC de gran importancia, es la HDAC5, la cual pertenece a la clase II A (Ruijter, *et al.*, 2003). Se ha observado que co-inmunoprecipita únicamente con miembros de la familia HDAC3, por lo que podría formar complejos multiproteicos. También interaccionan las proteínas MEF2 (factor potenciador de miocitos), dando lugar a la represión de los genes dependientes de MEF2. Finalmente, el uso del inhibidor de HDAC AR42, sobre cultivos celulares de la línea

U87MG de glioma, deriva en la desfosforilación de hTERT por la vía PI3K/Akt y la actividad de la holoenzima es suprimida en un alto porcentaje, sin decremento en los niveles de transcritos de hTERT, mientras el uso de inhibidores de fosfatasa restauran los niveles de Akt activado y de hTERT, indicando la participación de las HDACs en el control de la actividad de la holoenzima (Yang, 2013). En la siguiente tabla se muestra el efecto de la inhibición de la HDAC (rpd3) en el mantenimiento de los telómeros.

**Tabla 4.** Efecto de la inhibición o delección de HCAC, sobre genes relacionados con telómeros.

Organismo	Inhibidor o delección	Efecto sobre los genes relacionados con telómeros	Autor
Células humanas normales	Tricostatin	Activación transcripcional de <i>TERT</i> ; Alargamiento del telómero	Cong y Bacchetti, 2000
Células humanas de cáncer	Tricostatin	Activación de mecanismos ALT; Inalterado longitud del telómero	Jung, 2013
Cerdo clonado	Tricostatin	Activación transcripcional de <i>TERT</i> ; Alargamiento del telomero	Xie, 2012
<i>Alternaria alternata</i>	Tricostatin	Activación de genes del metabolismo secundario	Keats <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium expansum</i>	Tricostatin	Activación de genes del metabolismo secundario	Keats <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus nidulans</i>	Tricostatin	Activación del clúster de genes cercanos al telómero	Keats <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Delección	Activación del clúster de genes cercanos al telómero	Lee <i>et al.</i> , 2009
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tricostatin	Activación del de genes cercanos al telómero	Chung <i>et al.</i> , 2008

Lo anterior es de gran relevancia, debido a que se puede relacionar la función de la HDAC en el mantenimiento alternativo de los telómeros, debido a la desregulación transcripcional de algunos genes involucrados en estas vías. Aunado a esto, se tienen reportes que el tipo de HDAC (rpd3) (Yan Hu *et al.*, 2012), se encuentra relacionado con el reordenamiento de la cromatina en *U.maydis*, como se muestra en la siguiente tabla

**Tabla 5.** Efecto de la HCAC (rpd3), sobre la estructura de los telómeros.

Gene	Tel Length	Type II Frequency		Function (Annotation from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database)
		Deleting FLC in 6n mutants	Spores from tetrad: dissection	
<b>Telomere capping or maintenance</b>				
RFT1	L	52.2% (24/46)	50% (24/48)	Telomeric protein, binds to Rap1
RFT2	L	82.7% (42/49)	82% (34/40)	Telomeric protein, binds to Rap1
<b>Chromatin capping or maintenance</b>				
SAP30	S	74% (37/50)	44.7% (21/47)	Subunit of Rpd3 histone deacetylase complex
INO80	S	70.2% (34/48)	72% (34/47)	Subunit of Ino80 chromatin remodeling complex
INO80B	S	ND*	72% (36/50)	Subunit of Ino80 chromatin remodeling complex
<b>DNA-dependent Transcription</b>				
RPA14	L	73.5% (36/49)	59.6% (28/47)	RNA polymerase I subunit A14
RPO31	S	84.8% (41/48)	90.5% (36/40)	RNA polymerase II subunit R22.6
SOH1	S	48% (24/50)	46.3% (19/41)	Subunit of the RNA pol II mediator complex
<b>mRNA processing</b>				
RRP8	L	83.6% (44/53)	56% (28/50)	Methyltransferase; pre-mRNA cleavage at site A2
<b>Structural constituent of ribosome</b>				
RPS28B	L	45.7% (21/46)	53.2% (23/43)	Component of the small (40S) ribosomal subunit
<b>Transport &amp; membrane</b>				
GUP1	S	62.5% (30/48)	51.1% (22/43)	Plasma membrane protein in glycerol uptake

## 2.5.- Vías ALT de mantenimiento de los telómeros

En mutantes telomerasa negativas, el DNA telomérico es mantenido por medio de mecanismos de recombinación, conocido como “Alargamiento alternativo de los telómeros” (ALT) (Bryan, 1997). Aproximadamente el 85% de las células inmortalizadas de los tumores humanos usan la telomerasa para el mantenimiento de los telómeros, mientras que el 15% aplican los mecanismos ALT para el mantenimiento de los telómeros (Neumann, 2002).

En mutantes telomerasa negativa de *S. cerevisiae*, la mayoría de las células entran en estado de senescencia después de las 50–100 divisiones, cuando los telómeros se reducen a un tamaño aproximado de 100 pb. Sin embargo, un pequeño porcentaje de estas logra sobrevivir, debido a mecanismos de recombinación que les permite alargar los telómeros, a estas cepas se les denomina supervivientes (McEachern, 2006).

Estas supervivientes, están categorizadas en dos tipos, (Tipo I y Tipo II), las cuales presentan diferentes características a nivel de DNA telomérico y definidos por su dependencia sobre Rad52 más Rad51 o Rad50 respectivamente. Las supervivientes tipo I exhiben un gran amplificado en los elementos subteleroméricos Y' y secuencias cortas de repetido telomérico, y los productos génicos involucrados en esta vía son Rad52, Rad51, Rad54, Rad55 y Rad57. Por otro lado, las supervivientes Tipo II, presentan una larga secuencia de repetido telomérico, la cual es muy heterogénea, y los genes involucrados en esta vía son Rad 52, el complejo MRX (Mre11 – Rad50 – Xrs2) y Sgs1.

Cabe mencionar que las mutantes telomerasa negativas en *S.cerevisiae*, alrededor del 90% de las supervivientes generadas en medio sólido son del Tipo I, mientras que el 10% son del tipo II. Sin embargo las supervivientes Tipo II crecen más rápido que las Tipo I en medio líquido.

**Tabla 6.** Telotipo en *S. cerevisiae* (Makovets S., T. L. Williams and E. H. Blackburn 2007).

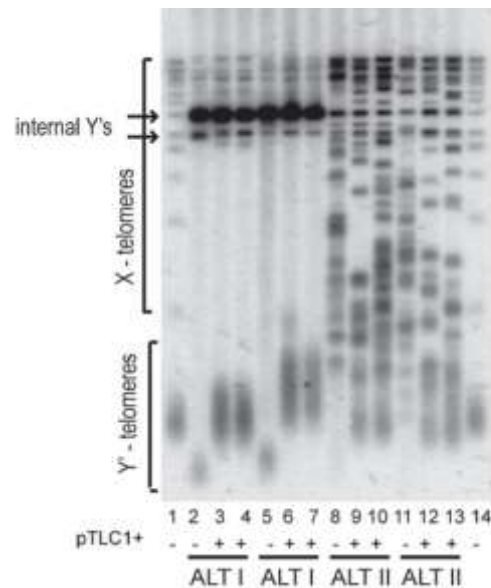
Yeast	Telomere Structure		Telomere maintenance (via)	Telotype
	X - telomeres	Y' - telomeres		
Telomerase + (WT)			Telomerase	TERT
Telomerase --				
Pre-survivors			NONE	SEN
Type I Survivors (TIS)			Rad51-Rad52	ALT I
Type II Survivors (TIIS)			Rad50-Rad52	ALT II

	(G1-3T) <sub>n</sub>
	Y' element
	X element
	non-telomeric DNA

En el siguiente gel, podemos observar las características del telómero, en los dos tipos de supervivientes Tipo I y Tipo II en mutantes telomerasa negativa de *S.cerevisiae*. Se puede observar un amplificado de Y en las supervivientes TIS (Type I Survivor) y un repetido telomérico muy heterogéneo en las supervivientes TIIS y escasa amplificación de los elementos Y.

**Imagen 5.** Análisis de hibridación Southern blot de los telómeros de TIS y TIIS antes y después de la reintroducción de la telomerasa funcional utilizando pTLC11 (Makovets S., T. L. Williams and E. H. Blackburn 2007).



## 2.6.- Cultivo *in-vitro* de plantas

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un contenedor en un ambiente artificial, el cual presenta dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento (Castillo A, 2004).

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad, escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo, sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante.

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, un explante de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los contenedores que contienen las plantas se ubican en lugares con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación. Se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro* (Castillo A, 2004).

#### **Ambiente químico**

- Composición del medio de cultivo
- pH

#### **Ambiente físico**

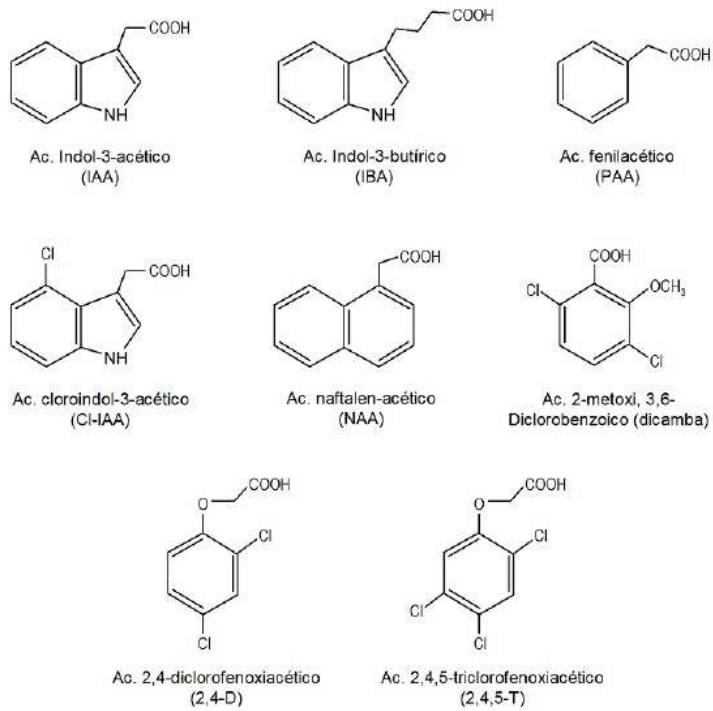
- Temperatura
- Luz y fotoperiodo
- Humedad

### **2.6.1.- Reguladores de crecimiento**

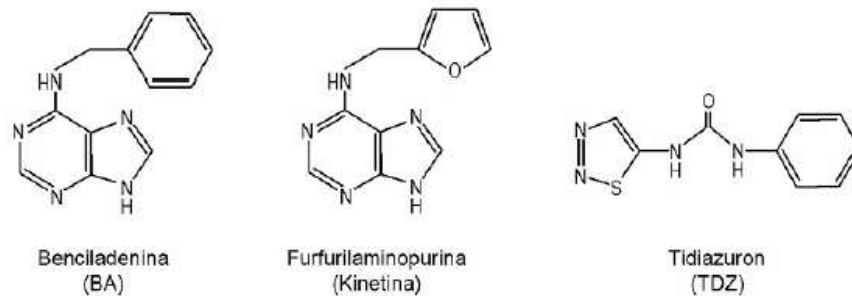
**Auxinas:** Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl- IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Ludwig-Müller Cohen 2002).

**Citocininas:** Citocininas estimula la progresión del ciclo celular. En primer lugar, a nivel de la fase G1, citocininas más otras hormonas (auxinas) inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Smith & Atkins 2002). Citocininas también estimularían la entrada a la fase M, probablemente por activación de una fosfatasa.

**Imagen 6.** Estructura de algunas auxinas naturales (IAA, IBA, PAA, Cl-IAA) y sintéticas (NAA, dicamba, 2,4-D y 2,4,5-T) (Ludwig-Müller & Cohen 2002).



**Imagen 7.** Estructura de algunas citosinas sintéticas (BA, Kinetina y TDZ) (Smith & Atkins 2002).

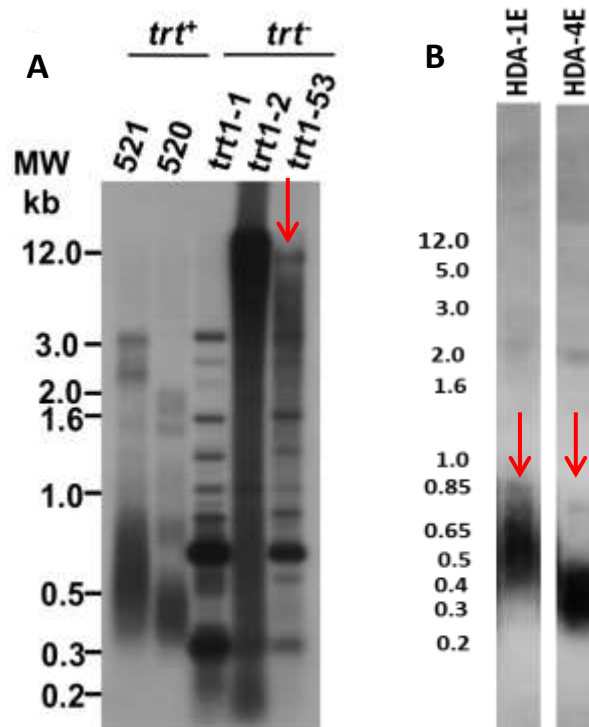


### 3.- Antecedentes.

El gen de la subunidad catalítica de la telomerasa *trt1*, en *U.maydis* se encuentra en el locus UMAG\_11198, consta de 4116 pb y codifica para una proteína de 1371 aa. Mutantes interrumpidas en este gen, dieron lugar a mutantes telomerasas negativas, todas del tipo de apareamiento (*a1 b1*). Se ha reportado en 2002 que la delección del gen *hda1* de *U.maydis*, causa la desrepresión de genes exclusivos de la fase micelial, lo cual abre la puerta al estudio de las vías ALT de mantenimiento de los telomeros en mutantes telomerasa negativas. Se tienen reportes, de la presencia de supervivientes telomerasa negativas en *S.cerevisiae*, las cuales son nombradas Like I y II, ambas presentan características teloméricas diferentes, como ya se ha mencionado anteriormente. En base a estos resultados, se tiene que en nuestro laboratorio, se han logrado obtener mutantes de *U.maydis*  $\Delta hda1$  y *trt1::hph*. Ambas son afectadas en el patrón del fragmento terminal de restricción (TRF); con el fin analizar el impacto de la delección de *hda1* en mutantes *trt*-.

En la siguiente imagen se observan los patrones teloméricos, correspondientes a las mutantes obtenidas en el laboratorio. Se decidió trabajar con las mutantes HDA-1E y HDA-4E, debido a que estas presentaban un alargamiento y un acortamiento respectivamente, y significativo, por lo que resulta de interés, trabajar con estas mutantes que presentan TRF diferentes.

**Imagen 8.** Patrón TRF de las mutantes parentales obtenidas en el equipo de trabajo (A). Mutantes en *trt1* (Dolores Bautista 2014), (B). Mutantes en *hda1* Galicia Sarmiento R, sin publicar BGM-ICUAP)



#### **4.- Justificación.**

El aumento en la longitud del telómero proviene de la actividad de telomerasa en células haploides de *U. maydis*. En mutantes histona deacetilasa-negativas sería importante determinar si los cambios en la longitud del telómero son debidos a cambios en la expresión de los genes involucrados en el mantenimiento del telómero como *trt1*, o en las vías alternativas basadas en recombinación, y determinar cuál es el impacto en el patrón de TRF en las superviviente telomerasa negativa cuando se deleta en éstas el gen *hda1*.

## **5.- Hipótesis.**

La desregulación transcripcional producida por la deleción de *hda1* de *U. maydis* provoca cambios en la longitud del telómero, los cuales pueden estar relacionados con la expresión de genes asociados al mantenimiento de los telómeros, y en la determinación del tipo de supervivientes telomerasa-negativas como ocurre en otros organismos; El análisis del patrón de TRF en las dobles mutantes  $\Delta hda1 trt1::hph$  bajo condiciones de cultivo seriado podría darnos algunos indicios sobre el mantenimiento del extremo cromosomal en *U. maydis*.

## 6.- Objetivo General.

Analizar el patrón de TRF, y expresión de genes relacionados con el alargamiento del telómero en mutantes de *U.maydis*  $\Delta hda1trt1::hph$ .

### 6.1.- Objetivos Particulares.

- I. Analizar las cruzas heterocigotas de las mutantes  $hda1\Delta$  X  $hda1$  para determinar si ésta mutación causa fenotipos asociados a haploinsuficiencia en el estado dicariótico biotrófico.
- II. A partir de las mutantes Trt1-53 ( $trt1::hph$ ) y HDA-1E ( $hda1\Delta$ ), HDA-4E ( $hda1\Delta$ ) generar dobles mutantes  $trt1::hph hda1\Delta$ , mediante cruzas en planta de maíz y analizar la velocidad de crecimiento.
- III. Analiza el patrón TRF en las dobles mutantes obtenidas.
- IV. Analizar la expresión de genes *Ku70*, *rad51* y *rad52*, determinar la abundancia de transcritos en las parentales 521 y 518, en las mutantes haploides Trt1-1, Trt1-2, Trt1-53 y HDA-1E, HDA-4E y en las dobles mutantes
- V. Analizar macro y microscópicamente si ocurre la formación de teliosporas en tejido de planta cuando se cruzan  $hda1\Delta$  X  $trt1::hph$ .

## **7.- Materiales y Métodos**

Las cepas de *U. maydis* utilizadas en este trabajo fueron 521 (*a1b1*) y 518 (*a2b2*) donada por el Dr. W.K. Holloman (Department of Microbiology and Immunology, Cornell University Weill Medical College, NY, USA), la cepas telomerasa negativas Trt1-1, Trt1-2 (*a1b1*) y Trt1-53 (*a2b2*), e histona deacetilasa negativas HDA-1E y HDA-4E (*a1b1*) pertenecen a la colección de cepas del laboratorio previamente obtenidas (Bautista-España *et al.*, 2014; Galicia-Sarmiento 2014). Las cepas de *U. maydis* se crecieron en medio mínimo (MM) o medio completo (MC) de Holliday (1974) suplementados cuando fue necesario con hygromycina (150 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis Missouri USA Chemical) o con carboxin (1 µg/ml) (Plant Media, BioWorld) o ambos.

### **7.1.-Extracción de DNA**

Sembrar un pre-cultivo en tubos de 5 ml con medio YEPS (extracto de levadura 10 %, peptona de caseína 20%, sacarosa al 20%) e incubar toda la noche a 30 °C. Inocular con 100 µl del pre-cultivo anterior en matraces con 50 ml de YEPS. Incubar a 30 °C en una estufa con agitación, hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub>=1.2 (aprox. 20-24 h), centrifugar a 3,500 rpm. Congelar la pastilla, colocándola en nitrógeno líquido y molerla en mortero; recuperar la molienda en tubos de fondo redondo, agregar 2 ml de buffer de extracción de hongos (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) mezclar hasta homogenizar. Agregar 2 ml fenol-cloroformo (fenol saturado en T.E. pH 8.2 y mezclar a partes iguales con cloroformo) y agitar hasta homogenizar la emulsión. Centrifugar durante 15 min a máxima velocidad y transferir cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo de fondo redondo. Extraer una vez más con fenol cloroformo como se ha descrito, y recuperar el sobrenadante en otro tubo. Agregar un volumen igual de cloroformo, agitar y recuperar la fase acuosa centrifugando 10 min a máxima velocidad, transferir la fase superior a un nuevo tubo y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol. Dejar a temperatura ambiente durante 30 min y recuperar la pastilla de DNA mediante centrifugación a máxima velocidad durante 5-7 minutos, enjuagar la pastilla dos veces en etanol al 70%, retirar todo y dejar evaporar completamente, resuspender el DNA en 500 µl de agua destilada estéril. Si fuese necesario, re extraiga nuevamente con fenol para limpiar mejor el DNA.

### **7.2.- Purificación de DNA con RNAsa**

A cada muestra de DNA, agregar 5 µl de RNAsa (100mg/ml). Mezclar bien e incubar a 37 °C durante 30 min, agregar 1 v de fenol-cloroformo. Isoamilico, mezclar con ayuda del vortex, centrifugar por 15 min a 13000 rpm, pasar el sobrenadante a otro tubo y agregar 1 v de cloroformo, mezclar con vortex y centrifugar 10 min a 13000 rpm. Pasar fase superior a otro tubo y agregar 0.5 v de acetato de amonio 7.5 M pH 5.5 y 2 v de EtOH absoluto frío,

mezclar y dejar precipitando durante 20 min a -20 °C, centrifugar 10 min a 13000 rpm y tirar el sobrenadante, lavar la pastilla dos veces con EtOH al 70% retirar el exceso y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente, resuspender en 100 µl de agua destilada estéril.

### **7.3.- Extracción de RNA**

Preparar un cultivo en 50 ml de medio YEPS a una  $DO_{600} = 0.8 - 1.0$ , centrifugar el cultivo por 10 min a 3500 rpm, retirar el sobrenadante y dejar la pastilla en congelación a -70°C durante .5 – 1 h. Moler la pastilla con ayuda de nitrógeno líquido y recuperarla en tubos con fondo redondo. Agregar 2 ml de Sol. A. (Acetato de sodio 0.02M pH=5.5, 0.5% de SDS y 1mM de EDTA) y 2 ml de Fenol- Acetato (Fenol saturado con acetato de sodio 0.02M pH=5.5). Homogenizar suavemente por inversión y separar en tubos eppendorf. Incubar en termoblock a 65°C por 10 min, agitando constantemente, centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4°C, separar la fase superior a otro tubo nuevo, y agregar 1 v de cloroformo, resuspender por inversión para homogenizar. Centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4°C, separar la fase acuosa a un tubo nuevo, dando entre 2 a 3 lavados con cloroformo, agregar 0.5 v de acetato de amonio 7.5 M pH 5.5. y 2 V de EtOH absoluto frio, homogenizar por inversión suavemente. Dejar precipitar a -70°C durante 1 h, centrifugar a 11000 rpm por 10 min a 4°C, tirar el sobrenadante y enjuagar la pastilla con EtOH al 70% dos veces, dejar secar la pastilla a temperatura ambiente el menor tiempo posible y resuspender en agua DEPC entre 100 y 200 µl, correr el gel a 60 Volts por 50 min para corroborar la calidad de la extracción.

### **7.4.- Limpieza de RNA con DNAsa**

Colocar 10 µl de muestra de RNA, en 50 µl de agua DEPC, agregar 5 µl de buffer de DNAsa y 1 µl de DNAsa (10mg/ml), incubar a 37 °C por 30 min. Realizar una PCR para algún gen constitutivo (Actina, Túbulina). Correr amplificado y reamplificado para corroborar. Llevar el volumen de la muestra a 300 µl y agregar 150 µl de acetato de amonio 7.5 M pH 5.5, homogenizar y agregar 400 µl de fenol- acetato- cloroformo- isoamilico, mezclar durante 30 seg en vortex y centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4 °C, separar sobrenadante y lavar 2 veces con 1400 µl de cloroformo. Recuperar el sobrenadante y agregar 1 ml de EtOH absoluto, dejar precipitar por 30 min a -70 °C y centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4 °C, tirar el sobrenadante y lavar la pastilla con EtOH 70%, dejar secar la pastilla y resuspender la pastilla en 30 µl de agua DEPC.

### **7.5.- Obtención de Progenie de *U.maydis*.**

Sacar las teliosporas de los tumores en forma aséptica, agregar 1 ml de  $CuSO_4$  al 1 %, machacar el tejido en un tubo, eliminar los restos de tejido vegetal, dejar durante 2-5 h a temperatura ambiente, centrifugar por 15 min a 2500 rpm, lavar 2-3 veces con agua

destilada estéril, resuspender en 1 ml, hacer diluciones para poner alrededor de 100 teliosporas por placa, usar medio completo adicionado con ampicilina (10mg/ml), para las dobles mutantes agregar carboxin e hygromicina (Cbx 1 µg/ml, Hyg 150 µg/ml), incubar a 28 °C, dejar crecer poco, las colonias deben ser muy pequeñas, agregar agar estéril y colectar con una espátula de vidrio las colonias, verter las esporidias en un tubo para centrifuga y homogenizar. Contar las esporidias en hematocitometro y ajustar a aproximadamente 100–1000 esporidias por caja, incubar nuevamente a 28 °C, replicar en medio con carbón activado pH = 7.0 para seleccionar levaduriformes, amplificar la población y guardar en DMSO 7%.

### **7.6.- Protocolo de infección.**

Sembrar las cepas de trabajo en placa, e incubar por 18 h a 28 °C, tomar una azada de la placa y sembrar en aproximadamente 5-10 ml de medio, dejar incubar durante 18 h a 28 °C, observar al microscopio, para descartar contaminación. Tomar 1 ml del pre cultivo y sembrar en 40 ml de medio, dejar incubar durante 18 h a 28 °C, observar al microscopio, centrifugar en tubos Falcón por 10 min a 2500 rpm, resuspender en 20 ml de agua destilada estéril y leer la absorbancia a 600 nm, volver a centrifugar a 2500 rpm x 10 min, resuspender en un volumen de agua destilada estéril, necesario para igualar las absorbancias, mezclar cantidades iguales de cada cepa (esporidias) en tubos nuevos y estériles, homogenizar perfectamente la mezcla, tomar 100 µl con jeringas estériles e inyectar a la planta, en el hipocotilo, una cantidad de 10 µl por planta.

### **7.7.- Protocolo de desinfección de semillas de maíz.**

Colocar las semillas en solución jabonosa al 3 % (Acción liquido comercial), durante 30-40 min, mantener en agitación manual o magnética, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril, para eliminar el detergente, (lavados de 2-3 min). (A partir de este paso, trabajar en la campana de flujo laminar). Pasar las semillas a un matraz estéril y sumergirlas en una solución de EtOH 70% por 30 seg, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril, transferir las semillas a un vaso estéril y sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, durante 10-15 min, lavar las semillas para eliminar restos del cloro (4-5 lavados), decantar la totalidad de agua de los lavados y dejar secar durante 5 min, sembrar las semillas en medio agar-agua para su germinación.

### **7.8.- Protocolo de desinfección de explantes.**

Colocar los explantes en solución jabonosa al 3 % (Acción liquido comercial), durante 10-15 min. Mantener en agitación manual o magnética, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril, para eliminar el detergente, (lavados de 2-3 min). (A partir de este paso, trabajar en la campana de flujo laminar), colocar los explantes a un matraz estéril y sumergirlos en



**UFC (Unidades Formadoras de Colonia).**

Para medir UFC realizar diluciones seriadas de 1/10, partiendo de 100 µl de cultivo en 900 µl de medio mínimo y así sucesivamente hasta 5 diluciones más de la misma forma. Posteriormente tomar 10 µl de cada dilución y sembrar en placas con medio YEPS, dejar abiertas las placas, hasta que secase perfectamente la gota de cultivo y colocar en la incubadora para su crecimiento y posterior conteo.

**Conteo en cámara Neubauer.**

Fijar 500 µl de cultivo, para posteriormente cuantificarlas. Lavar con 250 µl de buffer TBS y 250 µl de solución fijadora, homogenizar perfectamente, posteriormente centrifugar durante 5 min a máxima velocidad y resuspender en 500 µl de solución fijadora. Rotular perfectamente y almacenar a 4°C hasta su conteo.

Para contar, se utilizó el método de conteo por cuadrantes, tomar el promedio de células de 5 cuadrantes, y multiplicar por los factores de dilución realizados. A continuación se presenta la fórmula aplicada.

$$\text{Cuenta Neubauer} = (\bar{X} \text{ 5 cuadrantes}/16) * (400/0,1) * (1000/1).$$

## 8.- Resultados y discusión.

**8.1.- Objetivo 1** Analizar las cruzas heterocigotas de las mutantes *hda1Δ* X *hda1* para determinar si ésta causa fenotipos asociados a haploinsuficiencia en el estado dicariótico biotrófico.

Un evento de haploinsuficiencia, es una situación en la cual la proteína producida por una sola copia de un gen normal, no es suficiente para garantizar una función normal. Para este caso, se realizaron una serie de cruzas heterocigotas de las mutantes  $\Delta hda1$  (*hda1*-1E, *hda1*-4E) con la cepa silvestre *hda1* (518), y la mutante *trt1::hph* (Trt1-53) con la silvestre *trt1* (521), para poder definir si se presenta el proceso natural de la infección, así como la producción de teliosporas y determinar si es normal o se presenta alguna insuficiencia en ésta.

**Tabla 7.** Loci de apareamiento de las cepas de trabajo.

Cepa	Loci de apareamiento
518	<i>a2b2</i>
521	<i>a1b1</i>
HDA-1E	<i>a1b1</i>
HDA-4E	<i>a1b1</i>
Trt1-53	<i>a2b2</i>

En base a la tabla anterior, se realizaron las siguientes cruzas. El protocolo de infección en planta de maíz, se describe en la parte de metodologías, se llevó registro de infección cada tercer día (Anexos).

**Tabla 8.** Cruzas de trabajo

Cruza
518x521
518xHDA-1E
518XHDA-4E
521XTrt1-53

Posterior a la inoculación de las cruzas de *U. maydis* en plantas de maíz, se realizaron evaluaciones del desarrollo de la infección de plantas cada tercer día, obteniendo los siguientes promedios, correspondientes a tres repeticiones del ensayo Tabla 9.

**Tabla 9.** Análisis de infección de eventos de haploinsuficiencia.

Características de infección	518x521		518xHDA-1E		518xHDA-4E		521xTrt1-53	
	Días	%	Días	%	Días	%	Días	%
Aparición de síntomas	5+-1	81.25	5+-1	53.3	5+-1	60	5+-1	68.75
Agallas inmaduras	7+-1	75	7+-1	46.6	7+-1	13.3	7+-1	37.5
Agallas maduras	10+-2	62.5	11+-1	46.6	12+-1	45	16+-1	0
Contenido de telioesporas en agallas maduras	14+-1	+++ / +++	14+-1	++ / ++	14+-1	++ / ++	16+-1	0
Aparición de nuevos tumores	16+-1	0	16+-1	0	16+-1	~2	16+-1	~3

**Imagen 9.** Agallas producto de la infección en planta de maíz, con cruza de *U.maydis* (A1- A4); Control positivo, cruza 518x521, (B1- B4); Cruza heterocigota (518xHDA-4E), Cruza heterocigota (518xHDA-1E) y cruza heterocigota telomerasa (521xTrt1-53)

• **518x521**



• **518xHDA-4E**



• **518xHDA-1E**



• **521xTrt1-53**



Con base en los resultados obtenidos, se puede deducir, el porcentaje de infección y de formación de telioesporas, de las cruzas heterocigotas, en comparación con la cruza del control positivo, se vio reducida en cada una de ellas y en el caso de la cruza (521 x Trt1-53), se inhibió completamente la formación de telioesporas. En la siguiente tabla se presentan los porcentajes de infección de cada una de las cruzas.

**Tabla 10.** Porcentaje de infección de las cruzas de *U.maydis*, realizadas en planta de maíz.

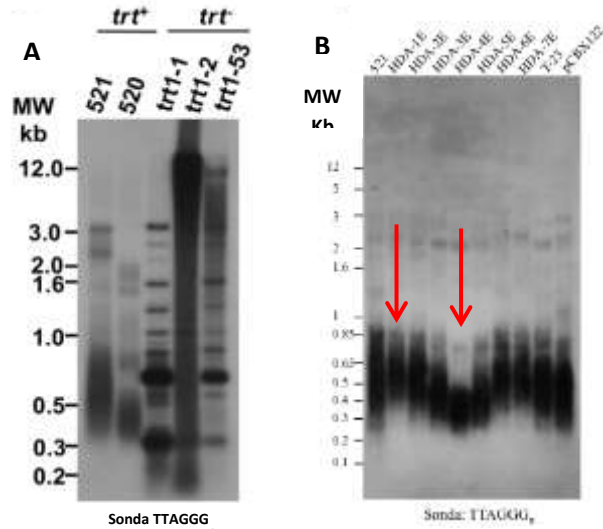
Cruza	% de infección (Total de plantas)
518x521	98
518xHDA-1E	43.3
518xHDA-4E	48.75
521xTrt1-53	55.85

Analizando los datos anteriores, se observaron eventos de haploinsuficiencia en las cruzas heterocigotas, debido a que el porcentaje de infección de las cruzas 518xHDA-1E y 518xHDA-4E es menor, con respecto al control, se observó una disminución de aproximadamente ~50%. Pero estos cambios no afectaron la formación de telioesporas, con excepción de la cruza de 521xTrt1-53, en donde hubo infección de la planta, pero no formación de telioesporas. En las cruzas restantes, se obtuvieron teliosporas, aunque en menor cantidad, pero funcionales, por lo que el modelo de estudio es viable, para poder continuar con la investigación. Esto nos permitió alcanzar el primer objetivo y pasar al siguiente objetivo.

**8.2.- Objetivo II. Generar la doble mutante *trt1::hph Δhda1* mediante cruza en planta de maíz y analizar la velocidad de crecimiento.**

Se decidió trabajar con las mutantes *Trt1-53*, *HDA-1E* y *HDA-4E*, debido a que presentaban un TRF muy característico, en especial entre las mutantes *HDA-1E* y *HDA-4E* ya que presentaban un telómero largo y otro telómero corto respectivamente, como se muestra en la siguiente imagen. Con el objetivo de poder esclarecer un poco el tipo de supervivientes que se estaban generando, se seleccionaron estas cepas para trabajar.

**Imagen 10.** Patrón de TRF de las mutantes: (A)- Mutante *trt-*, (B) Mutantes *Δhda1*.



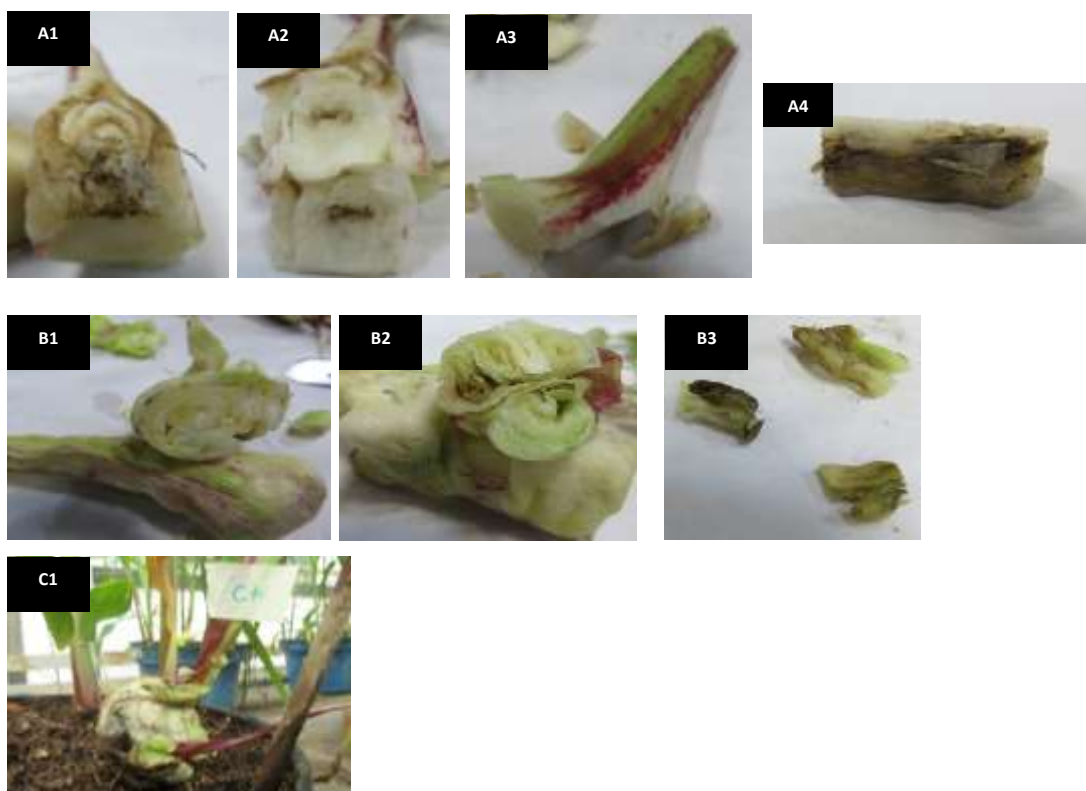
Se generó la doble mutante *Δhda1 trt1::hph*, mediante cruce en planta de maíz, de las cepas parentales *Trt1-53 (a2b2)* con *HDA-4E* y *HDA-1E (a1b1)*. Las cruza se generaron como lo describe Puhalla (1968) y se ha descrito en la parte de metodología. Las infecciones se realizaron en plantas de maíz (*MCS-02*), a los 5 días post-germinación Posterior a la infección, se llevó el registro del ensayo cada tercer día, el cual se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 11.** Análisis de infección en cruza dobles mutantes.

Características de infección	518x521		518xHDA-1E		518xHDA-4E	
	Días	%	Días	%	Días	%
Aparición de síntomas	4+-1	85.6	6+-1	40.5	6+-1	38
Agallas inmaduras	7+-1	80	9+-1	52.3	10+-2	30.5
Agallas maduras	11+-1	85	18+-2	37.2	20+-2	21
Contenido de teliosporas en agallas maduras	13+-1	+++ / +++	20+-2	++ / ++	22+-2	+ / +
Aparición de nuevos tumores	17+-1	0	25+-1	0	25+-1	0

Es muy importante señalar que, la formación telioesporas en las dobles mutantes, no se dio a nivel superficial de la planta, como ocurre normalmente en las cruza con las cepas WT, si no que estas presentaron la formación de telioesporas a nivel interno de la agalla, dejando ver solo una delgada línea visible a nivel superficial; sin embargo al momento de realizar los cortes correspondientes dentro de las agallas, se observó claramente la formación de telioesporas. Una característica particular de estas dobles mutantes, es la formación de puntos pequeños de color violeta, en las agallas, las cuales no corresponden a la formación habitual de antocianinas.

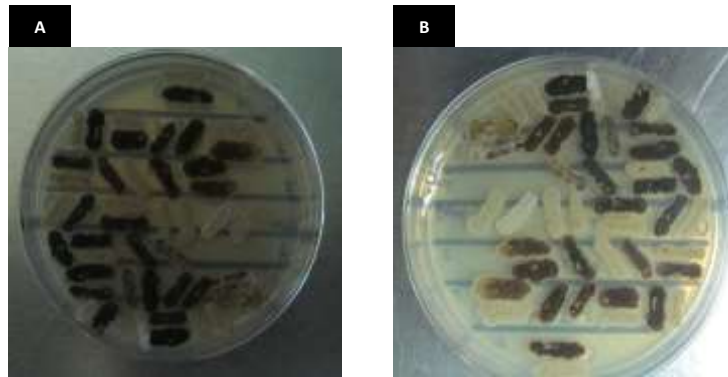
**Imagen 11.** Agallas producto de la infección en planta de maíz, con cruza de *U. maydis* dobles mutantes: (A1-A4); Cruza Trt1-53xHDA-1E, (B1-B3)- Cruza Trt1-53xHDA-4E, (C1)- Control positivo (518X521).



Como se observa en las imágenes anteriores, la formación de telioesporas en la dobles mutantes, se presentó dentro de la agalla, igual que en las WT, solo que en las dobles mutantes, la formación de estas fue escasa, no logra formar agallas grises llenas de teliosporas, como en las cruza WT.

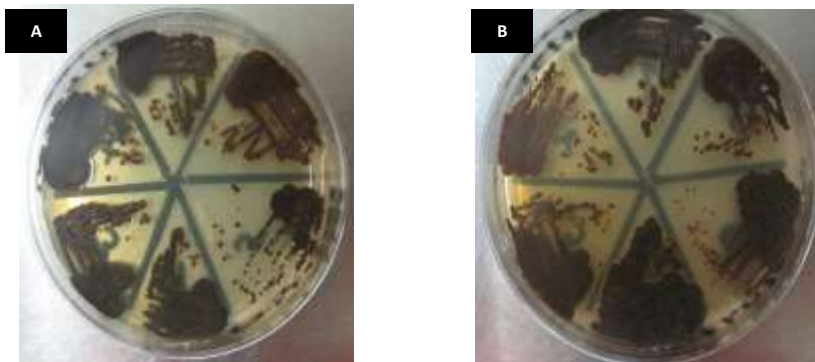
Una vez obtenidas las telioesporas fueron desinfectadas y germinadas en medio MC, como lo describe Hollyday (1974). Suplementado con higromicina (150 µg/ml) y carboxina (1 µg/ml) se obtuvo ~90% de germinación de telioesporas, para ambas cruza.

**Imagen 12.** Dobles mutantes (A) colonias recuperadas de la cruce Trt1-53xHDA-1E, (B) colonias recuperadas de la cruce Trt1-53 x HDA-4E.



De estas telioesporas se obtuvieron las dobles mutantes, 6 mutantes para la cruce de HDA-1E X Trt1-53 (MHT531-(1,2,3,4,5 y 7) y 5 mutantes para la cruce de HDA-4E X Trt1-53 (MHT534-(1,2,3,4,6)). Se muestran las imágenes a continuación.

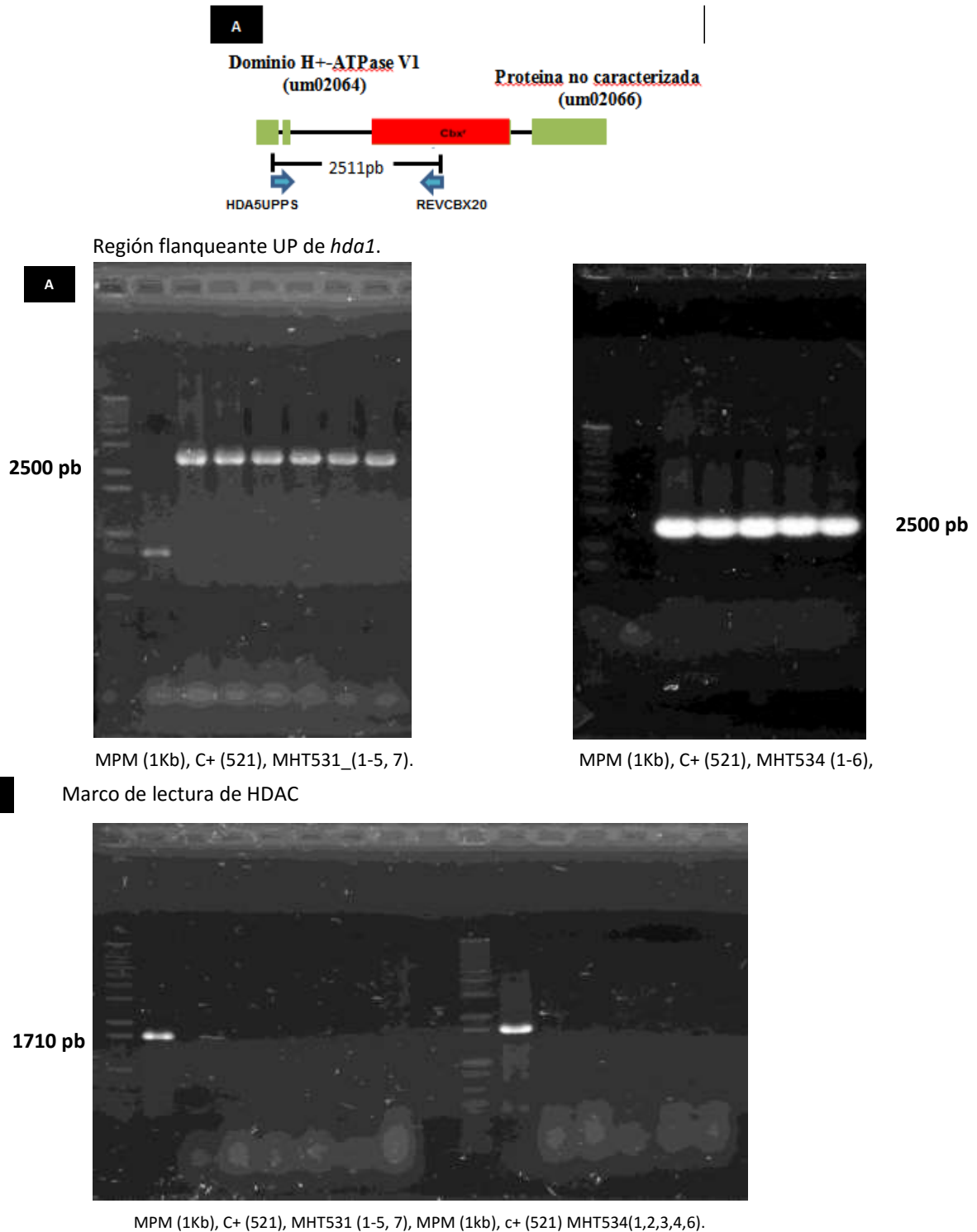
**Imagen 13.** Dobles mutantes seleccionadas (A) 6 colonias recuperadas de MHT531, (B) 5 colonias recuperadas de MHT534.



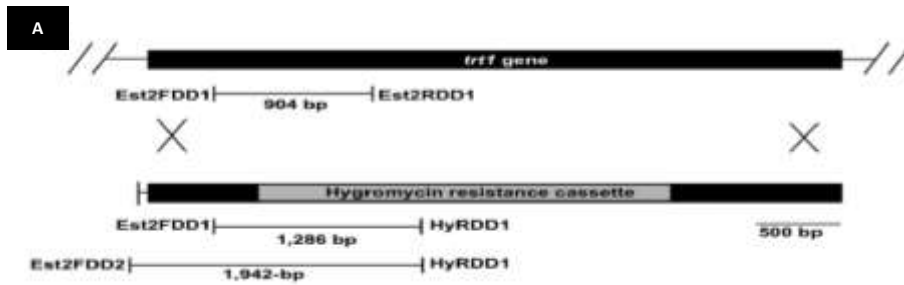
Una vez obtenidas estas dobles mutantes, se procedió a realizar la verificación de estas, por medio de PCR. La estrategia consistió en amplificar los fragmentos que se describen en el mapa de cada una de las mutaciones, en las siguientes figuras. Para analizar la interrupción del gen *hda1* se amplificaron fragmentos que abarcaron parte del marcador de selección y uno de los tramos flanqueantes del cassette de interrupción, desde secuencias de DNA cercanas pero no comprendidas en el cassette de interrupción. Las cepas parentales Trt1-53 y HDA-1E, HDA-4E se incluyeron como controles en los ensayos de amplificación (Datos no mostrados).

- Comprobación de la presencia del cassette de interrupción para *hda1* en las dobles mutantes.

**Imagen 14.** Comprobación de la interrupción de *hda1* en las dobles mutantes (A) Región flanqueante río arriba de *hda1* (~2500 pb), (B) Marco de lectura de *hda1* (~1700 pb).



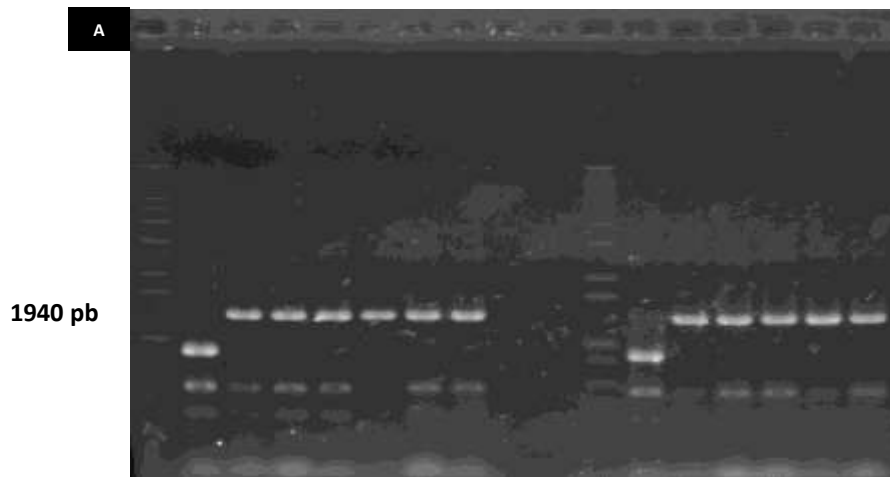
- Comprobación de la interrupción de *trt1* en las dobles mutantes.



Cassette de interrupción de la telomerasa.

- Electroforesis de PCR, comprobatorios de interrupción de *trt1*

**Imagen 15.** Verificación de la interrupción de *trt1* en las dobles mutantes (A)- Región flanqueante río arriba de *trt1* (~1940 pb).



MPM (1Kb), C+ (521), MHT531 (1-5, 7), MPM (1kb), c+ (521) MHT534 (1,2,3,4,6).

Con respecto a los resultados anteriores, se puede confirmar que se logró obtener las doble mutantes ( $\Delta hda1 trt1::hph$ ). Las diferentes pruebas realizadas para corroborar las mutaciones, salieron conforme a lo esperado: no se presentó amplificación por parte de las dobles mutantes para el marco de lectura de *hda1*, el cual tienen un tamaño esperado de 1710 pb, así mismo lo corroboró el hallazgo del amplificado de 2500 pb de la región flanqueante del cassette de interrupción de este mismo gen, lo cual asegura que este fue mutado correctamente. Con respecto a la verificación de la interrupción de *trt1* de la telomerasa, se amplificó un fragmento que incluye parte del cassette de interrupción de *trt1* y parte de la región 5' del gen, el cual tiene un tamaño estimado de 1942 pb; Aunado al hecho de que fueron sometidas a presión de selección con higromicina y carboxina. Por lo tanto y en base al análisis anterior, se puede afirmar que se obtuvieron dobles mutantes verdaderas.

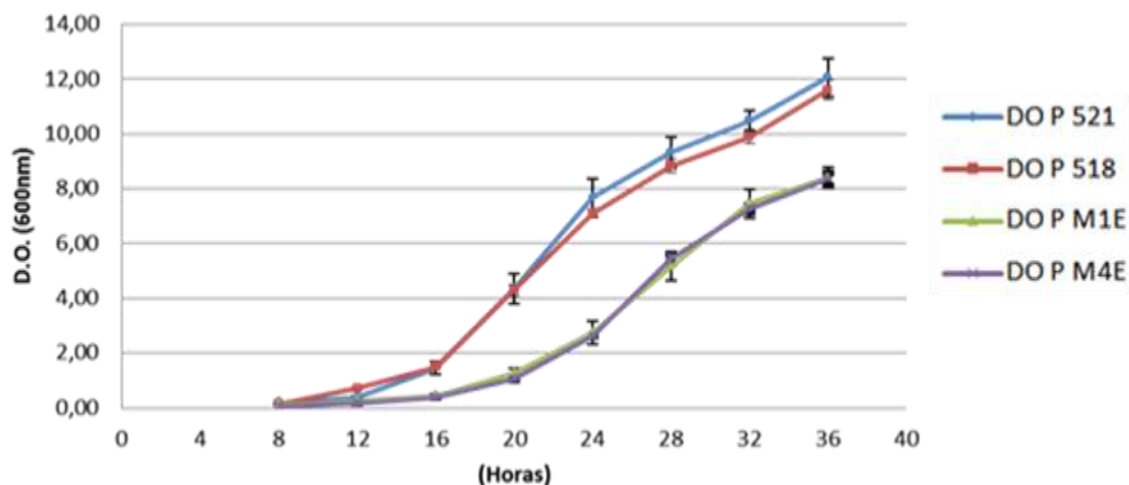
Una vez verificadas las interrupciones en las dobles mutantes, se realizaron cinéticas de crecimiento, para las dos variantes de mutantes obtenidas. MHT531 y MHT534. Los períodos fueron de 36 h para todas las cepas WT y dobles mutantes. Los parámetros analizados en estas cinéticas, fueron D.O., U.F.C. y cuenta total de células en cámara de Neubauer. Los registros se hicieron antes de iniciar al tiempo T=0, y posteriormente se hicieron las mediciones durante el desarrollo de las cinéticas de crecimiento. Se dejaron en agitación y temperatura constantes. A las 8 h después de haber sido inoculado, se tomaron alícuotas del matraz, para medir los parámetros antes mencionados

A continuación se presentan los promedios obtenidos de las tres repeticiones, para los parámetros a evaluar.

**Tabla 12.** Densidades ópticas promedio a 600 nm, de las cepas WT y dobles mutantes a diferentes tiempos de crecimiento: ( $\bar{X}$ -521 Densidad óptica promedio de 521,  $\bar{X}$ -518 Densidad óptica promedio de 518,  $\bar{X}$ -MHT531 Densidad óptica promedio de MHT531,  $\bar{X}$ -MHT534 Densidad óptica promedio de MHT534)

Horas	$\bar{X}$ -521	$\bar{X}$ -518	$\bar{X}$ -MHT531	$\bar{X}$ -MHT534
8	0.18	0.14	0.09	0.04
12	0.38	0.70	0.27	0.15
16	1.45	1.50	0.44	0.38
20	4.35	4.30	1.26	1.04
24	7.67	7.10	2.74	2.62
28	9.32	8.83	5.16	5.45
32	10.48	9.90	7.46	7.26
36	12.07	11.61	8.40	8.36

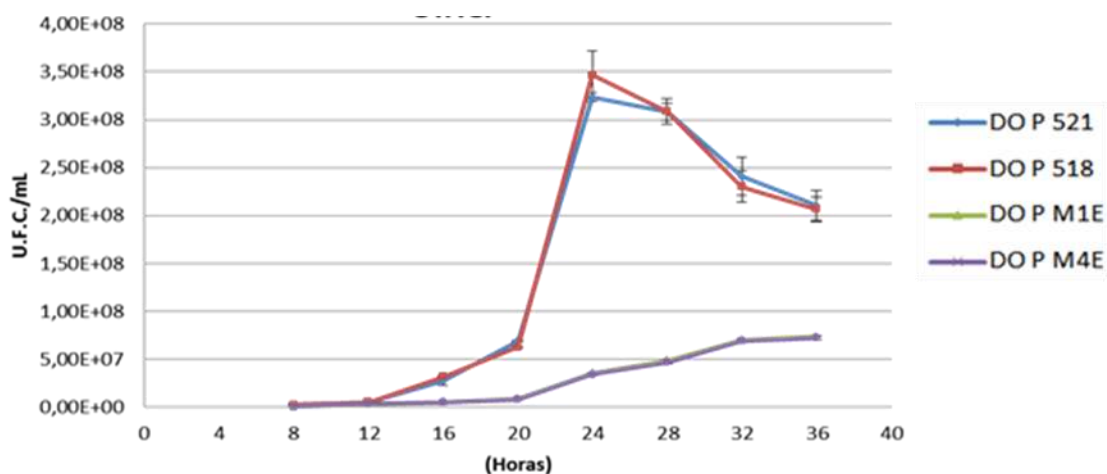
**Grafica 1.** Grafica de cinéticas de crecimiento respecto a la DO a 600 nm ( C+ 521,518), dobles mutantes (M 1E (MHT531), M 4E (MHT534)).



**Tabla 13.** Cuenta viable de las cepas silvestres y mutantes en UFC/ml. unidades formadoras de colonias por mililitro se grafican a diferentes tiempos de crecimiento:  $\bar{X}$ -521 cel/ml promedio de 521,  $\bar{X}$ -518 cel/ml promedio de 518,  $\bar{X}$ -MHT531 cel/ml promedio de MHT531,  $\bar{X}$ -MHT534 cel/ml promedio de MHT534)

Horas	$\bar{X}$ -521	$\bar{X}$ -518	$\bar{X}$ -MHT531	$\bar{X}$ -MHT534
8	2.53e6	2.31e6	6.50e5	6.12e5
12	5.02e6	5.07e6	2.83e6	3.63e6
16	2.71e7	3.15e7	5.07e6	4.87e6
20	6.89e7	6.23e7	8.48e6	8.30e6
24	3.23e8	3.47e8	3.53e7	3.41e7
28	3.08e8	3.08e8	4.87e7	4.70e7
32	2.41e8	2.30e8	6.98e7	6.92e7
36	2.10e8	2.07e8	7.23e7	7.23e7

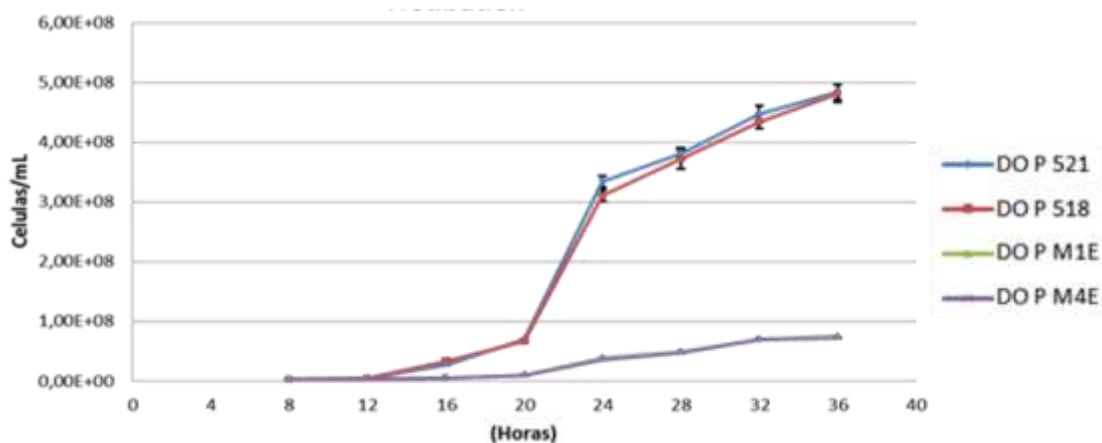
**Grafica 2.** Grafica de cinéticas de crecimiento determinando la cuenta viable (UFC /ml). (C+ 521,518), dobles mutantes (M 1E (MHT531), M 4E (MHT534))



**Tabla 14.** Conteo en cámara de Neubauer de las cepas WT y dobles mutantes a diferentes tiempos de crecimiento: ( $\bar{X}$ -521 cel/ml promedio de 521,  $\bar{X}$ -518 cel/ml promedio de 518,  $\bar{X}$ -MHT531 cel/ml promedio de MHT531,  $\bar{X}$ -MHT534 cel/ml promedio de MHT534)

Horas	$\bar{X}$ -521	$\bar{X}$ -518	$\bar{X}$ -MHT531	$\bar{X}$ -MHT534
8	3.60e6	3.40e6	1.28e6	1.02e6
12	5.10e6	5.18e6	3.72e6	3.73e6
16	2.80e7	3.42e7	5.42e6	6.03e6
20	6.97e7	6.66e7	1.01e7	9.85e6
24	3.35e8	3.10e8	3.87e7	3.68e7
28	3.82e8	3.72e8	4.96e7	4.78e7
32	4.47e8	4.35e8	7.01e7	7.00e7
36	4.85e8	4.82e8	7.58e7	7.31e7

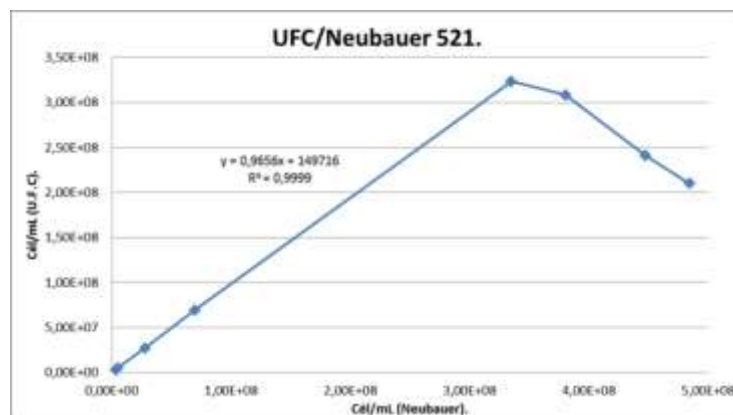
**Grafica 3.** Grafica de cinéticas de crecimiento respecto a conteo en cámara de Neubauer (cel/ml). (C+ 521,518), **dobles mutantes** (M 1E (MHT531), M 4E (MHT534)).



Una vez obtenida las curvas, se compararon los resultados de conteo en placa de UFC y conteo en cámara de Neubauer, con el objetivo de analizar el comportamiento de estas cepas a diferentes etapas de la cinética de crecimiento y la relación que debe de existir, al momento de contar por ambas formas.

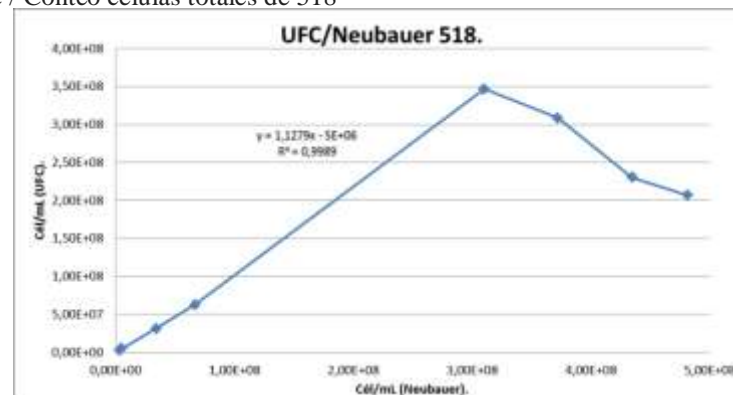
**Grafica 4.** Relación conteo UFC / Conteo células totales de 521

Tiempo	521 P Células/mL Neu.	WT P521 (Cel / mL) UFC
8	3,60E+06	2,53E+06
12	5,10E+06	5,02E+06
16	2,80E+07	2,71E+07
20	6,97E+07	6,90E+07
24	3,35E+08	3,23E+08
28	3,81E+08	3,08E+08
32	4,47E+08	2,41E+08
36	4,85E+08	2,10E+08



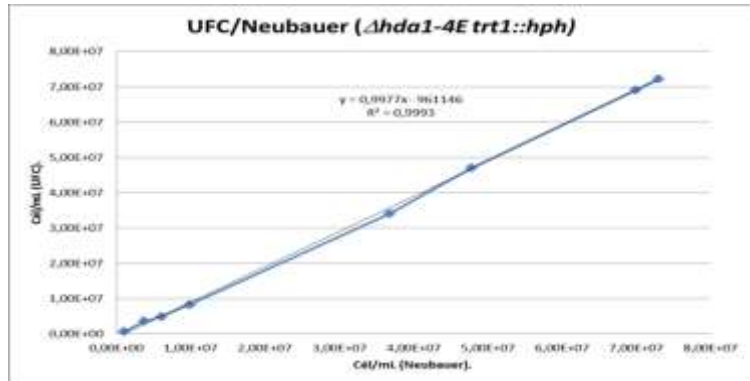
**Grafica 5.** Relación conteo UFC / Conteo células totales de 518

Tiempo	518 P Células/mL	WT P518 (Cel / mL)
8	3,40E+06	2,31E+06
12	5,18E+06	5,07E+06
16	3,42E+07	3,15E+07
20	6,66E+07	6,23E+07
24	3,10E+08	3,47E+08
28	3,72E+08	3,08E+08
32	4,35E+08	2,30E+08
36	4,82E+08	2,07E+08



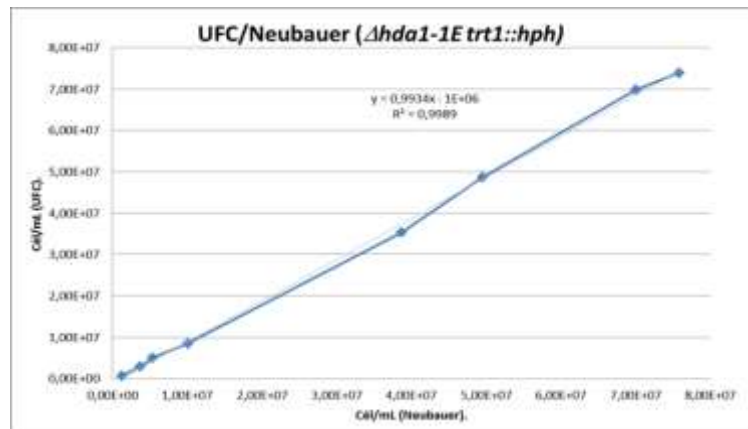
**Grafica 6.** Relación conteo UFC / Conteo células totales de (MHT534)

Tiempo	4E P Células/mL	P M4E (Cel / mL)
8	1,02E+06	6,12E+05
12	3,73E+06	3,63E+06
16	6,03E+06	4,87E+06
20	9,85E+06	8,30E+06
24	3,68E+07	3,41E+07
28	4,78E+07	4,70E+07
32	7,00E+07	6,92E+07
36	7,31E+07	7,23E+07



**Grafica 7.** Relación conteo UFC / Conteo células totales de 1E (MHT531)

Tiempo	1E P Células/mL	P M1E (Cel / mL)
8	1,28E+06	6,50E+05
12	3,72E+06	2,83E+06
16	5,42E+06	5,07E+06
20	1,01E+07	8,48E+06
24	3,87E+07	3,53E+07
28	4,96E+07	4,87E+07
32	7,01E+07	6,98E+07
36	7,58E+07	7,39E+07



Analizando los datos anteriores, se dedujo que, el comportamiento de ambas curvas de crecimiento, fue el esperado, debido a que los valores de la fase exponencial de ambas curvas presentan una relación lineal. Para el caso de las WT, al momento de llegar a fase estacionaria, la cifra del conteo de células en la cámara de Neubauer no revela un descenso o haber alcanzado el *plateau*, de hecho mostró un aumento en el número absoluto, pero en conteo de UFC cuenta solo las células capaces de formar colonias, y nos mostró claramente lo que sucede con el número de células viables. La relación de la cantidad de células que aparece en la fase estacionaria en la cámara de Neubauer no correspondió al valor descrito para el conteo de células. En las gráficas, podemos observar una correlación lineal, con una pendiente de  $\sim 1$ , lo cual corresponde a la relación de conteo de UFC comparado con conteo en cámara de Neubauer.

## Tiempo de Generación.

En base en las cinéticas anteriores y a los datos obtenidos en cada una de las gráficas, se obtuvieron los tiempos de generaciones, para cada una de las dobles mutantes y las WT. Donde se encontraron diferencias significativas en el tiempo de generación, comparando la WT con las dobles mutantes. A continuación se presentan los datos obtenidos al analizar el tiempo de generación de estas cepas. Para obtenerlo, se utilizó la siguiente fórmula, la cual se encuentra en cualquier libro de ingeniería

### Tiempo de Generación (G).

$$n = 3.3 \log (y/x)$$

$$G = T(\min)/n$$

Para obtener (*n*), se utilizaron los valores de conteo en placa de UFC. Teniendo para el valor de (*y*) se tomara la cantidad de UFC a las 24 y 36 h, el cual corresponde al valor más alto de concentración celular (células/ml), en las cinética de crecimiento para las WT y mutantes, respectivamente. Para el valor (*x*), se tomara el valor a las 8h, para ambas cepas, que es donde comenzó la fase exponencial.

Tabla 15. Valores de células/ml por UFC, para tiempo de generación (G).

Horas (h)	WT P521 (Cel / mL)	WT P518 (Cel / mL)	MHT531 (Cel / mL)	MHT534 (Cel / mL)
8	2,53E+06	2,31E+06	6,50E+05	6,12E+05
12	5,02E+06	5,07E+06	2,83E+06	3,63E+06
16	2,71E+07	3,15E+07	5,07E+06	4,87E+06
20	6,89E+07	6,23E+07	8,48E+06	8,30E+06
24	3,23E+08	3,47E+08	3,53E+07	3,41E+07
28	3,08E+08	3,08E+08	4,87E+07	4,70E+07
32	2,41E+08	2,30E+08	6,98E+07	6,92E+07
36	2,10E+08	2,07E+08	7,39E+07	7,23E+07

Diagrama de anotaciones: Una caja roja con 'Y' apunta a la fila de 24 horas. Una caja roja con 'X' apunta a la fila de 8 horas. Una caja roja con 'Y' apunta a la fila de 36 horas.

Se realizaron los cálculos, obteniendo los siguientes valores para (*n*).

Tabla 16. Valores de (*n*).

Cepa	N
WT 521	6.93
WT 518	7.18
MHT531	6.78
MHT534	6.83

Para poder determinar los valores de (**G**), se tomaron diferentes tiempos, ya que para las WT su pico de crecimiento fue a las 24 h y para el caso de las mutantes, aún continuo elevándose, por lo tanto se tomó el valor máximo a las 36 h. A continuación se presentan los tiempos de generación para cada cepa, incluidas las parentales HDA-1E y HDA-4E.

**Tabla 17.** Tiempos de generación para WT (521,518), Parentales (HDA-1E y HDA-4E) y dobles mutantes (MHT531, MHT534).

Cepa	G (min)	G (Horas)
521	138.53	2.18
518	133.70	2.13
HDA-1E	150	2.30
HDA-4E	170	2.50
MHT531	247.79	4.07
MHT534	245.97	4.06

Se encontró que las cepas, tienen tiempos de generación diferentes. Las dobles mutantes presentaron un tiempo de generación mayor a las de la WT y parentales, en caldo YEPS, teniendo un tiempo de generación para las parentales 518 y 521 de 2.13 y 2.18 h, respectivamente, las cepas parentales HDA-1E y HDA-4E presentaron un tiempo de generación de 2.30 y 2.50 h respectivamente. Con respecto a las dobles mutantes, se obtuvo un tiempo de generación para MHT531 ( $\Delta hda1 trt1::hph$ ) y MHT534 ( $\Delta hda1 trt1::hph$ ) de 4.07 y 4.06 horas, lo cual es casi el doble de tiempo, comparado con las WT y las parentales HDA-1E y HDA-4E, es decir la velocidad de crecimiento es más lenta.

### 8.3.- Objetivo III. Analizar el patrón TRF en las dobles mutantes obtenidas.

Para determinar el impacto de la mutación doble en los genes *hda1* y *trt1* sobre el patrón del TRF, a las cepas parentales Trt1-53 Y HDA-1E y HDA-4E, se les extrajo el DNA y se digirió con la enzima *PstI*. Se analizó su TRF mediante ensayos de Southern Blot utilizando como sonda el repetido telomérico. Posteriormente, se realizó el mismo análisis utilizando el DNA total de las dobles mutantes subcultivadas 0, 50 y 100 generaciones, las muestras se digirieron con la enzima *PstI*, la cual liberó la región telomérica (Sánchez y Guzmán 1998). Se procedió a realizar el análisis Souther-blot utilizando para la hibridación una sonda (TTAGGG)<sub>n</sub> marcada con <sup>32</sup>P. A continuación se presenta el número de las generaciones de los cultivos de las mutantes y silvestres con las que se trabajaron, esto

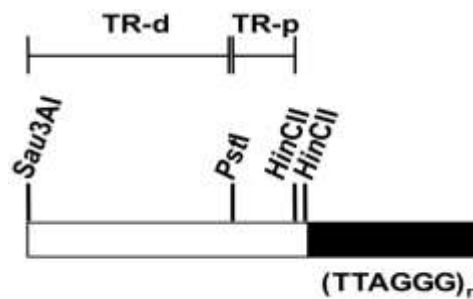
considerando el tiempo que se tomó desde la obtención de las dobles mutantes, al momento de comenzar este ensayo.

**Tabla 18.** Número de generaciones de las dobles mutantes.

Número de generación
T0
50G
100 G

Repetido telomérico y el TR-p se muestran el esquema de la zona de corte de esta enzima imagen 16.

**Imagen 16.** Estructura telomérica en *U.maydis* (Sánchez y Guzmán, 1998)



Las muestras se sembraron en caldo YEPS, y en base a las cinéticas de crecimiento realizadas previamente, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener cepas a un tiempo 0 (T0), a las 50 generaciones (50G) y a las 100 generaciones (100G). En la tabla anterior, se muestran las verdades generaciones para cada uno de los tiempos definidos a 0, 50 Y 100 generaciones.

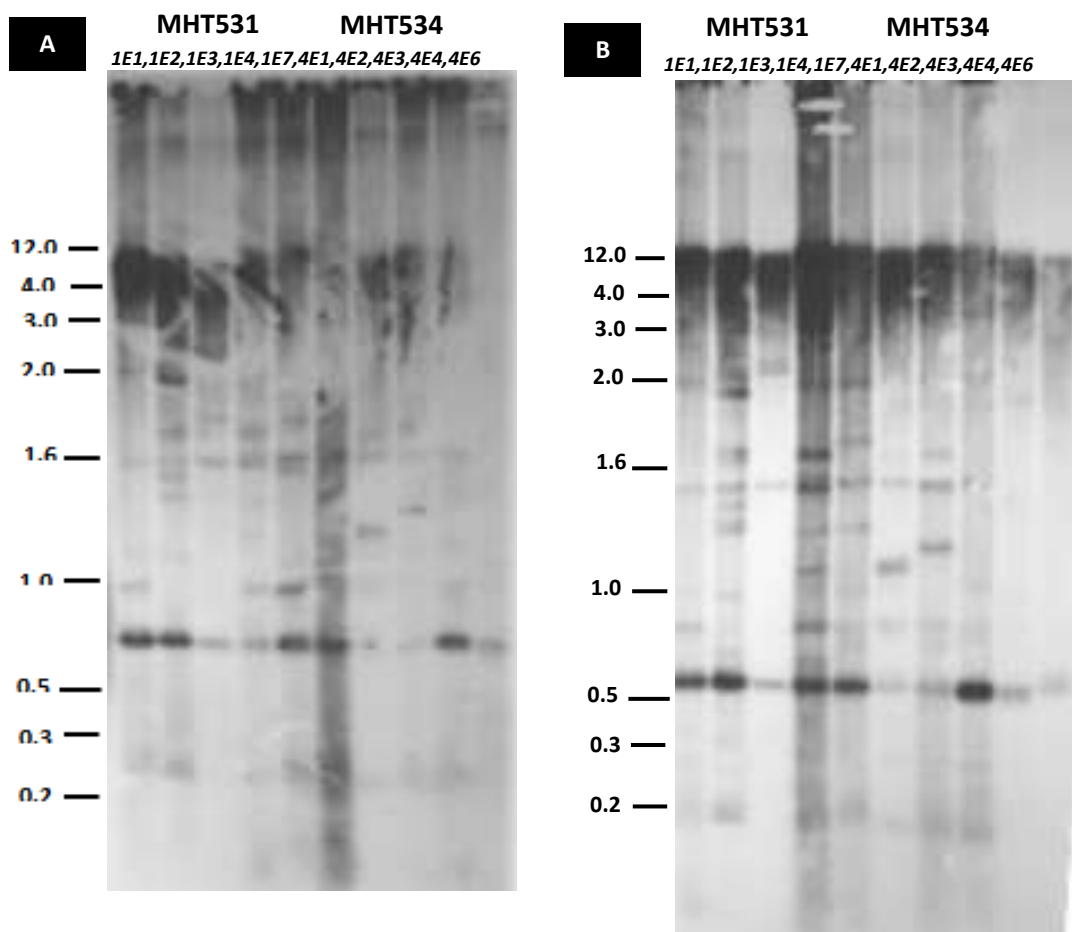
**Tabla 19.** Días de crecimiento para dobles mutantes a 0, 50 y 100 G (Generaciones)

(G)	Días
T0	0
GO G	8
100 G	16

Una vez obtenido los DNA de las dobles mutantes, a diferentes generaciones, se realizó una cuantificación de cada una de ellas (Anexos)

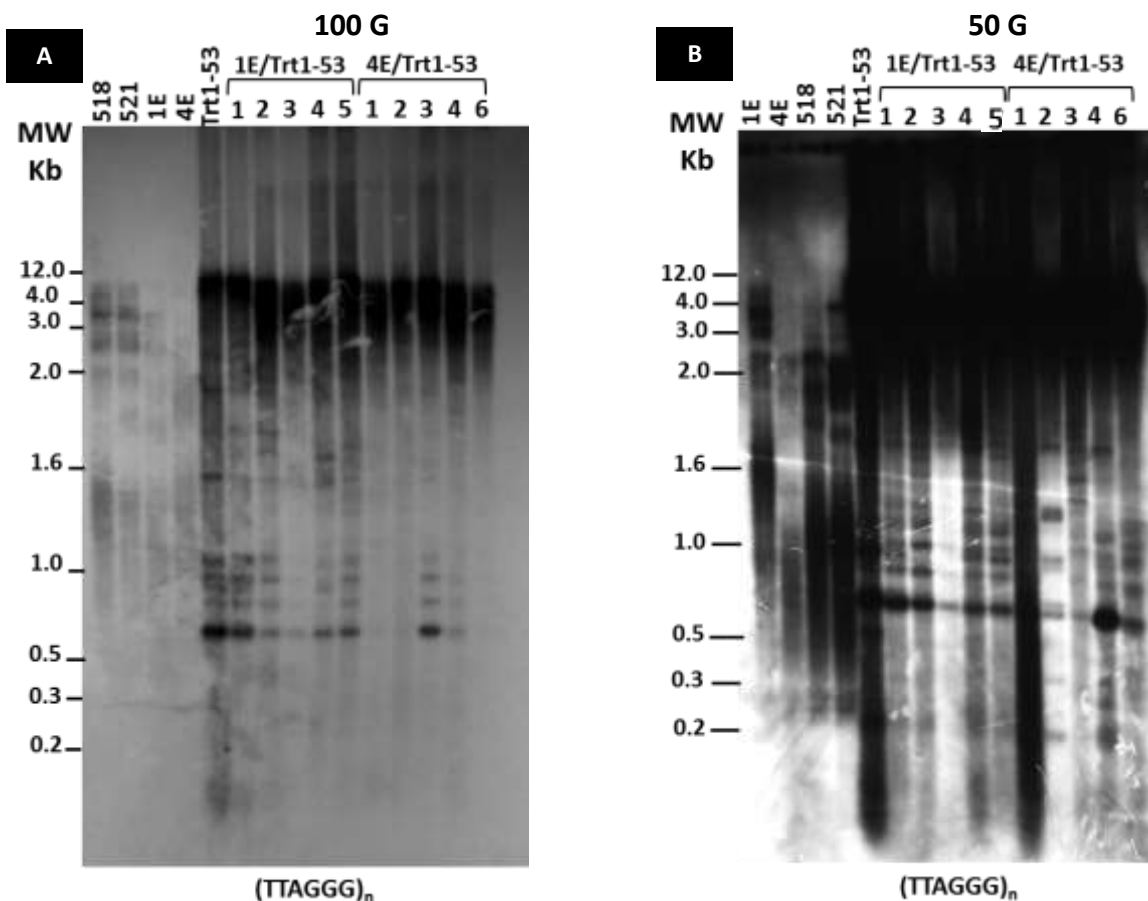
Una vez que se tuvieron todas las digestiones, se realizaron los ensayos de hibridación Souther-blot, utilizando sondas marcadas de (TTAGGG)<sub>n</sub> con <sup>32</sup>P como se describen en la sección de materiales y métodos. En las siguientes imágenes, se muestran las autorradiografías de las muestras anteriores

**Imagen 17.** Autorradiografías de las dobles mutantes (A) 50 generaciones y (B) 100 generaciones



Podemos observar, que presenta un patrón de TRF similar en los dos tiempos de generación, sin embargo, existen bandeados específicos, que en la autorradiografía se van atenuando, estos bandeados corresponden a un peso aproximado de 0.6 a 0.7 Kb. Con base a los datos anteriores, se volvieron a realizar las digestiones de las muestras anteriores, tomando en cuenta a las generaciones 50 y 100, que es en donde se presentaron características de interés más marcadas. Por lo cual, se repitieron las digestiones con *Pst1* (Anexos). Para las hibridaciones, se tomó en cuenta a las cepas parentales, (518, 521, HDA-1E, HDA-4E, Trt1-53). Esto con el objetivo, de comparar los patrones teloméricos, con las diferentes generaciones de la progenie de las dobles mutantes. A continuación se muestran las autorradiografías correspondientes a estas generaciones.

**Imagen 18.** Autorradiografías de las dobles mutantes con las WT y cepas parentales  
(A) 50 generaciones, (B) 100 generaciones, 6µg por carril



Con base en las imágenes anteriores, y tomando en cuenta el tiempo de exposición distinto de ambas membranas, podemos decir de forma presuntiva, que a las 50 generaciones en las dobles mutantes MHT531 y MHT534, el patrón predominante de tipo de telómero es una mezcla de telómeros Tipo I y Tipo II ya que se presentan repetidos teloméricos muy largos (barrido en la parte superior) y en bandas de menor tamaño que varía sugiriendo más de una especie de fragmentos. Después de 100 generaciones, se observó un cambio en la intensidad de la señal del telómero (parte superior del gel) en las cepas provenientes de la cruce MHT534, y se observó un desvanecimiento del bandeo correspondiente al patrón análogo al Tipo I de supervivientes, lo cual sugiere que está ocurriendo un cambio de tipo de telómero, pues la intensidad de la señal de fragmentos teloméricos más largos es mayor, los cuales se observan alrededor de 12 Kb. Este fenómeno es interesante, debido a que esta cruce, proviene de una cepa parental HDA-4E que posee un tipo de telómero homogéneo y corto. Estos resultados apuntan hacia un fenómeno de intercambio de tipo de telómero, el cual deberá de ser analizado en trabajos posteriores, en donde aparte de analizar la longitud el repetido telomérico, se deberán de analizar el alargamiento o acortamiento de las secuencias asociadas a telómero, para poder corroborar si ocurre un fenómeno similar al de *S.cerevisiae* y poder definir el telotipo de estas dobles mutantes en *U.maydis*.

**8.4.- Objetivo IV. Analizar la expresión de genes *ku70*, *rad51* y *rad52*, determinar la abundancia de transcritos en las parentales 521 y 518, en las mutantes haploides Trt1-1, Trt1-2, Trt1-53 y HDA-1E, HDA-4E y en las dobles mutantes.**

Aunque las imágenes anteriores sugirieron cambios sutiles en los patrones de restricción, posiblemente en las derivadas de la cruce *trt1::hph* X  $\Delta$ *hda1* HDA-1 y HDA-4 pudieran existir cambios en el patron de expresión de algunos genes. Con el objeto de profundizar el estudio se diseñaron y se mandaron a sintetizar oligonucleótidos específicos para genes que de interés. El enfoque inicialmente fue dirigido a las enzimas involucradas en eventos de recombinación. Los oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia de DNA de genes ortólogos de distintos organismos eucariotas utilizando el paquete de programas BLAST (U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, Health & Human Services) y el banco de datos público del genoma de *U. maydis* [http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_t237631\\_Ust\\_maydi\\_v2GB](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_t237631_Ust_maydi_v2GB).

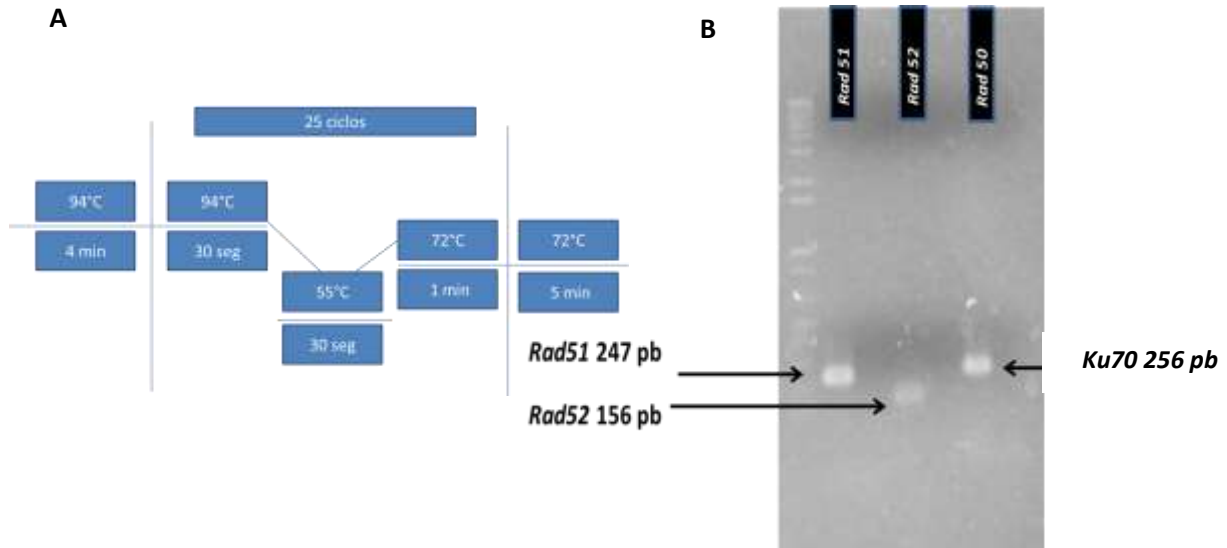
A continuación se muestra la tabla, con las características de los oligonucleótidos, fueron diseñados con el programa *Ape oligo editor*, y analizados con el programa libre (***oligo analyzer***). Es importante señalar, que ninguno de estos genes analizados, presentan intrones.

**Tabla 20.** Diseño de oligos, para los genes *Rad51*, *Rad52*, *Rad50* y *ku70*.

Primers	Secuencia	TM	Amplicón	Gen ID
Rad51	For5'CTCGCTTACCTCGCTTTATC3' Rev5'CTTGCGTAGTGACAATCTCG3'	53 °C 53.4 °C	247 pb	ref XM_754344.1
Rad52	For5'AGACAAGCAGAATACCAACC3' Rev5'GTGACAATCTGGTGCGATTC3'	52.4 °C 54 °C	156 pb	ref XM_756043.1
Ku70	For5'GGAAGCAAGAGGGTATTCTG3' Rev5'CGTCATCGTAATGAGCAAAG3'	52.8 °C 51.5 °C	220 pb	ref XM_756202.1

Se procedió a realizar pruebas, para corroborar que no presentaran alguna falla en el diseño, que la TM (Temperatura melting), fuera la correcta o que no presentaran algunos problemas, como amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros. A continuación se presenta el programa de amplificación de estos genes y su posterior amplificación, revelado en un gel de agarosa

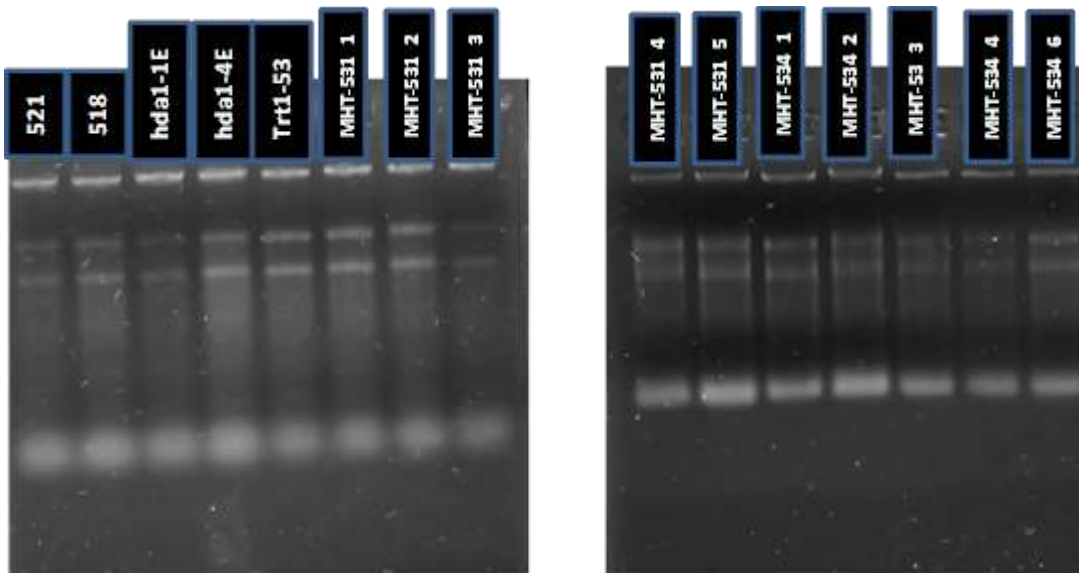
**Imagen 19.** Comprobación de la especificidad de amplificación (A). Programa de amplificación, (B). Gel de agarosa con amplicones específicos.



Como se observa en la imagen anterior, no presentaron amplificaciones inespecíficas para los genes de interés, por lo cual se realizó la extracción de RNA, la síntesis de cDNA y se realizaron los experimentos para analizar la abundancia de transcritos.

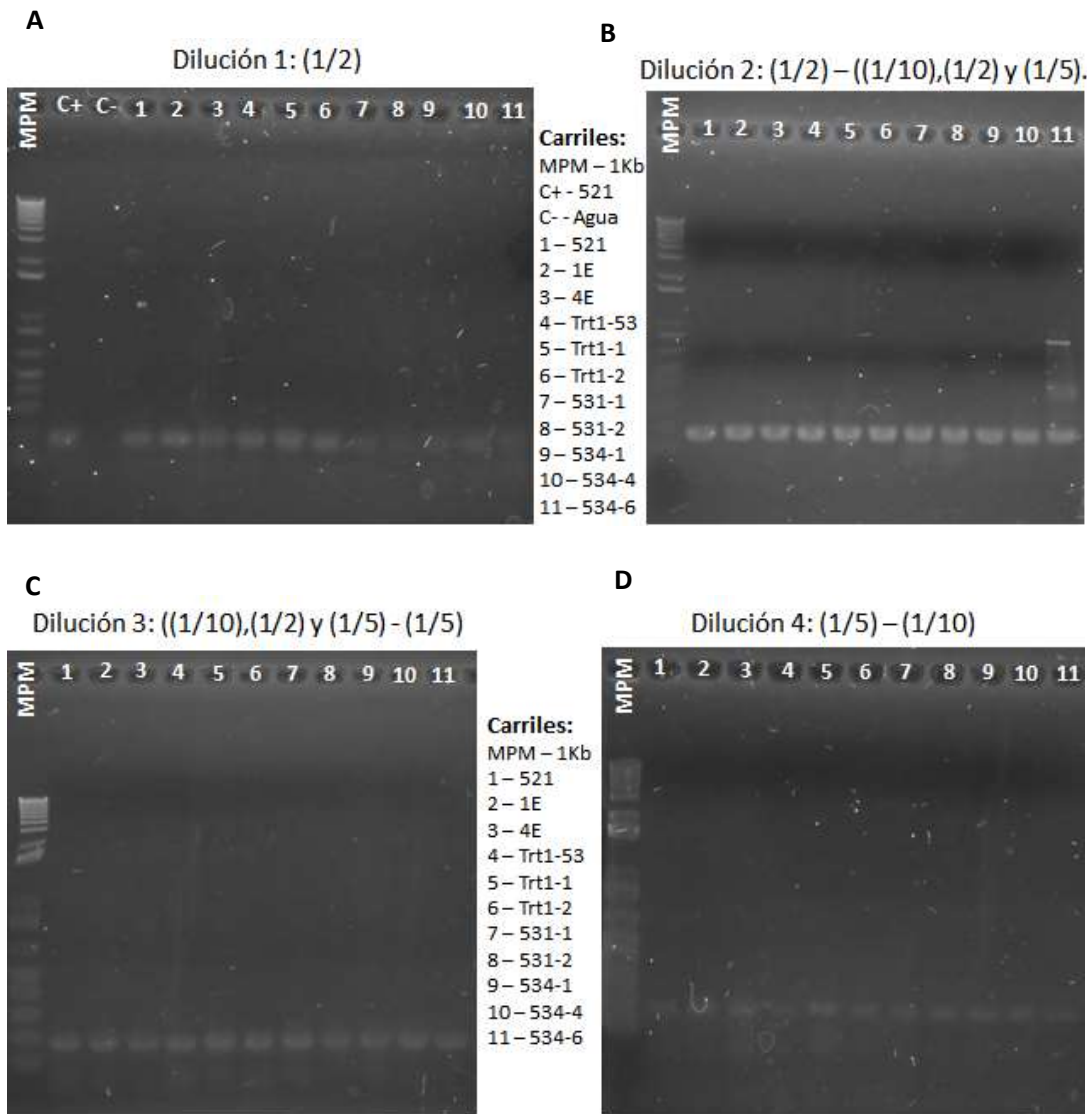
Se extrajo RNA de las dobles mutantes y de las parentales, al momento en el que el cultivo, presentara una DO de entre 0.6 y 0.8 para poder obtener una cantidad suficiente de RNA de interés. En las siguientes imágenes se observa la calidad del proceso de extracción de RNA.

**Imagen 20.** Extracción de RNA de las **WT** (518,521), **parentales** (Trt1-53, HDA-1E y HDA-4E) y **dobles mutantes** (MHT531 y MHT534).



Se hicieron PCR semicuantitativos, con el objetivo de tener la misma cantidad de cDNA, en cada reacción. Se realizaron amplificaciones con el gen constitutivo de actina, para hacer ajustes de concentración, respecto a la secuencia de referencia. A continuación se muestran las amplificaciones realizadas con diferentes diluciones.

**Imagen 21.** PCR de diluciones de cDNA con oligonucleótidos específicos de Actina, para ajustar la misma cantidad de cDNA en cada reacción (A). Dilución 1 (1/2), (B). Dilución 2 (1 - 6, 1/10), (7 - 8, (1/2), (9 - 11, 1/5), (C). Dilución 3 (1 - 6, 9 - 11, 1/5), (7 - 8, 1/2), “Dilución de Trabajo”, (D). (1 - 11, 1/5).

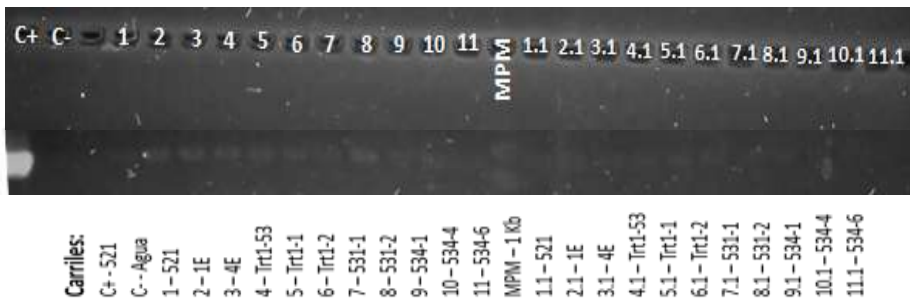


Con base a los geles anteriores, se pudo observar que presentan la misma intensidad de banda a partir de la dilución 3, por lo cual se decidió tomar esa como la dilución de trabajo. Se realizó una dilución más para poder corroborar si no existía algún cambio, con una dilución más. A partir de estos ensayos, se realizaron las PCR semicuantitativas para los genes de interés, *Rad51*, *Rad 52* y *Ku70*. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de estos genes.

**Imagen 22.** PCR de diluciones de cDNA con oligos específicos para *Ku70*, *Rad51* y *Rad52*, misma cantidad de cDNA en cada reacción (A). *Ku70* (B). *Rad52*, (C). *Rad51*.

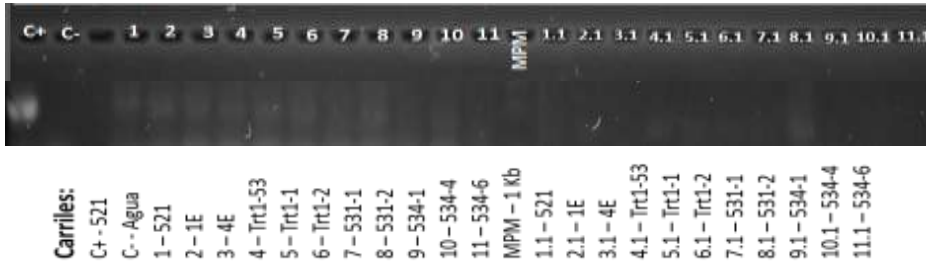
**A**

- **Ku 70.**



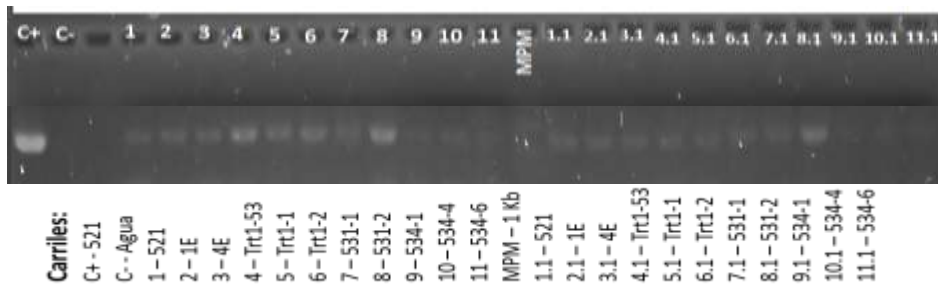
**B**

- **Rad 52.**



**C**

- **Rad 51.**



En base a los resultados anteriores observamos que no existen modificaciones en la intensidad de banda, para los genes estudiados (*Rad51*, *Rad52* y *Ku70*), por lo que corresponde a lo esperado, en donde se sabe que no son genes inducibles. Sin embargo, para el ensayo del gen *Rad51*, posiblemente estuviera presentándose una ligera cantidad mayor de transcritos, debido a que se logró observar un ligero cambio en la intensidad de la banda. Para lo cual se deben de realizar más ensayos para poder concluir que existiera un aumento en la cantidad de estos transcritos, por lo que por el momento, estos resultados se podrían tomar como preliminares, de algo que debe de ser corroborado para poder definir exactamente el telotipo de estas dobles mutantes.

**8.5.- Objetivo V. Analizar macro y microscópicamente si ocurre la formación de teliosporas en tejido de planta cuando se cruzan *hda1*Δ X *trt*-.**

Debido a que en el proceso de infección maíz-*U.maydis*, el tipo de tejido de la planta de maíz, su capacidad de crecimiento y desarrollo juegan un papel importante, y que en las cruza heterocigóticas de *U. maydis trt1::hph* X WT la velocidad de crecimiento de la agalla es lenta y no se necrosa (datos no mostrados), nos enfocamos a tratar de establecer un sistema para analizar el proceso infeccioso en tumores crecidos *in vitro* utilizando como punto de partida los tumores de una crusa heterocigótica y observar al microscopio.

Para el desarrollo de este experimento se utilizó la técnica de inoculación en plántulas de maíz, con 5 días de emergidas, como describe Puhalla (1968) o variantes de la misma en la inoculación post emersión para cultivar callos en medios de cultivos a partir de explantes de planta de maíz infectados con *U.maydis*. Inicialmente se llevó a cabo el ensayo, creciendo los tumores en el invernadero. En la tabla 21 se muestra el resultado de diferentes cruza, con la estimación de la infectividad que presentaban mediante cruces.

**Tabla 21.**Tabla de infección de cruza en invernadero, para micropropagación.

Características de infección	518x521		Trt1-2xTrt1-53		Trt1-1xTrt1-53	
	Días	%	Días	%	Días	%
Aparición de síntomas	4+-1	62.5	4+-1	66.6	4+-1	43.7
Agallas inmaduras	8+-2	25	9+-2	20	9+-2	12.5
Agallas maduras	14+-2	62.5	15+-2	60	15+-2	12.5
Contenido de teliosporas en agallas maduras	16+-2	+++/>+++	0	0	0	0
Aparición de nuevos tumores	18+-2	0	15+-1	~2	15+-1	~1

Analizando la tabla de infección, observamos, que las cruza de Trt1-2/Trt1-53 y 518/521, producen un buen porcentaje de agallas, las cuales, se trabajaron para micropropagación. Los explantes se sometieron a un proceso de desinfección, con el objetivo de eliminar los contaminantes presentes en el invernadero. Una vez desinfectados los explantes, se sembraron en medio MS adicionado con hormonas vegetales, para inducir la formación de nuevos brotes. En las siguientes imágenes se muestran las macetas con plantas infectadas, que contienen agallas, de donde fueron tomados los explantes para los ensayos de micropropagación.

Se eligió este sistema debido a que la velocidad de crecimiento y persistencia de los tumores de las cruces heterocigotas de cepas trt+ X trt- pudieran ser cultivables, por lo que se hicieron explantes axenicos, para generar callos en medio MS.

**Imagen 23.** Macetas con plantas infectadas en el invernadero



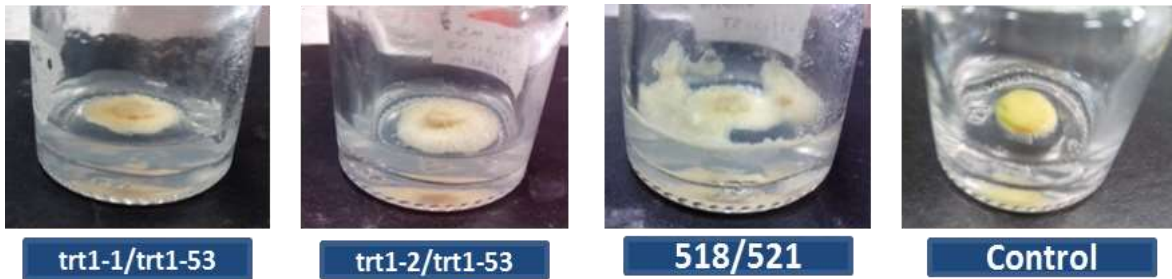
Los explantes fueron cortados de manera transversal a la agalla, tratando de obtener trozos de aproximadamente medio centímetro, estos explantes fueron colocados en el medio MS de forma apical, para mantener el flujo ascendente de nutrientes hacia la planta. Se cerraron parcialmente y se cubrieron totalmente con papel aluminio, se dejaron en obscuridad y a temperatura ambiente de 2-3 días, esto con el objetivo de no estresar los explantes y pudieran desarrollarse perfectamente.

**Imagen 24.** Explantes desinfectados, sembrado en medio MS.



Al finalizar el tercer día de incubación dentro del Percival se observó un crecimiento alrededor de los explantes de tumoraciones, pero el control negativo se mantuvo limpio. A continuación se muestran las imágenes de los explantes y el crecimiento microbiano observado alrededor. Al observar al microscopio se identificó un microorganismo con todas las características de *U. maydis*.

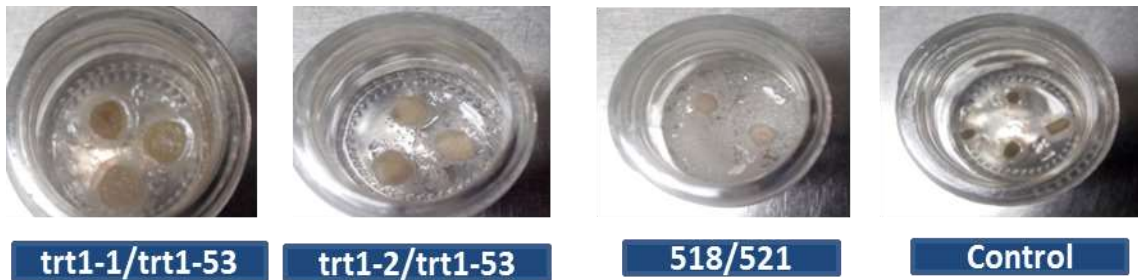
**Imagen 25.** Explantes en medio MS, cubierto por el crecimiento de algún microorganismo.



Este crecimiento impidió la viabilidad de los explantes vegetales. Para descartar alguna contaminación que pudiera no haber sido eliminada durante el proceso de desinfección, se repitió el experimento, agregando al medio MS hygromicina 150  $\mu\text{g/ml}$  (Hyg), el cual es un bacteriostático y antifúngico. Se tomaron explantes del invernadero y fueron sometidos al proceso de desinfección. Una vez desinfectados, fueron sembrados en medio MS adicionado con hygromicina (150  $\mu\text{g/ml}$ ), dejando los mismos tiempos y condiciones de incubación anteriores.

Al cabo del sexto día de incubación, se observó nuevamente la formación de un crecimiento alrededor de los explantes, esta ocasión en menor cantidad. Pero de igual forma, este crecimiento había impedido el desarrollo del explante. En las siguientes imágenes, se observa de nuevo el crecimiento alrededor de los explantes, el control negativo continuo sin mostrar crecimiento.

**Imagen 26.** Explantes en medio MS con (Hyg), cubierto por el crecimiento de algún microorganismo.



Al analizar al microscopio este crecimiento, permitió rastrear la fuente de contaminación que impidió el desarrollo del explante. De cada frasco se realizó un análisis microscópico *in fresco*, tomando muestra del crecimiento alrededor del explante. Después de visualizar las muestras se encontraron esporidias de *U. maydis*. Las imágenes adquiridas de los frotos *in fresco* se muestran a continuación. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio óptico marca Nikon, modelo labophot-2, con un zoom de 40 x, acoplado a una cámara digital.

**Imagen 27.** Imágenes tomadas al microscopio, del crecimiento presente alrededor y encima de los explantes (A1-A3)- Trt1-1/Trt1-53, (B1-B3)- Trt1-2/Trt1-53, (C1-C3)- 518/521, (D1)-Control negativo.

- **Trt1-1/Trt1-53**



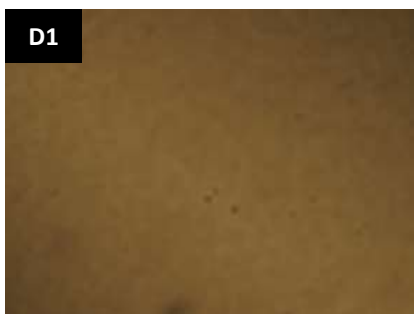
- **Trt1-2/Trt1-53.**



- **518/521**



- **Control.**



Debido al lavado exhaustivo al que se sometieron los explantes, y al crecimiento de *U. maydis* resistente a antibióticos que se presenta en forma pura. Descartamos que se tratara de un agente de contaminación externo o de alguno que se hubiese presentado durante el proceso de desinfección e inoculación por el lavado al que se sometieron los explantes, incluyendo el control en que no tuvo crecimiento. Es quizá posible atribuir este efecto a la cantidad de esporidias sin aparear al momento de realizar la infección en planta; debido a que las esporidias de *U. maydis* pueden comportarse de manera saprofita, posiblemente la cantidad de esporidias con la que fueron infectadas las plantas fue demasiada, ocasionando que algunas de estas queden sin aparearse, provocando los efectos adversos que observamos.

Para evitar el crecimiento de esporidias de *U. maydis* en los explantes, se decidió efectuar la infección en plántulas de maíz axénicas, así como efectuar la infección arriba del tallo y realizar las cruces con 100 µl de suspensiones  $10^6$  U.F.C/ml, para disminuir la posibilidad de dejar esporidias sin aparear. Adicionalmente se probó tomar explantes de hojas, debido a la lejanía del sitio de punción, para evitar en lo posible la contaminación con esporidias que quedarán adheridas a la plántula y que pudieran ser fuente de contaminación.

- **Generación de plántulas de maíz axénicas.**

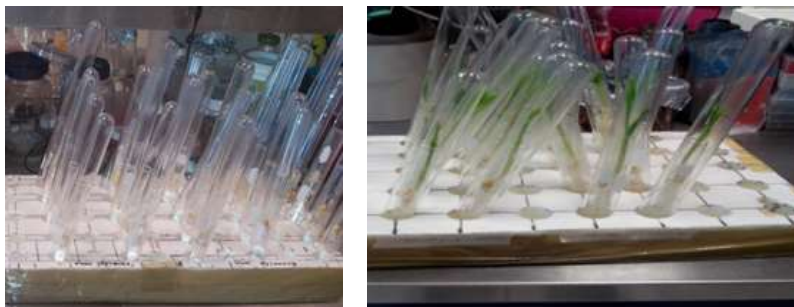
Se desinfectaron las semillas conforme al protocolo de desinfección de semillas, descrito en material y métodos, se colocaron en medio agar - agua y se cubrieron con papel aluminio totalmente durante 3-4 días, para su germinación.

**Imagen 28.** Semillas de maíz sembradas en medio agar-agua, para su germinación



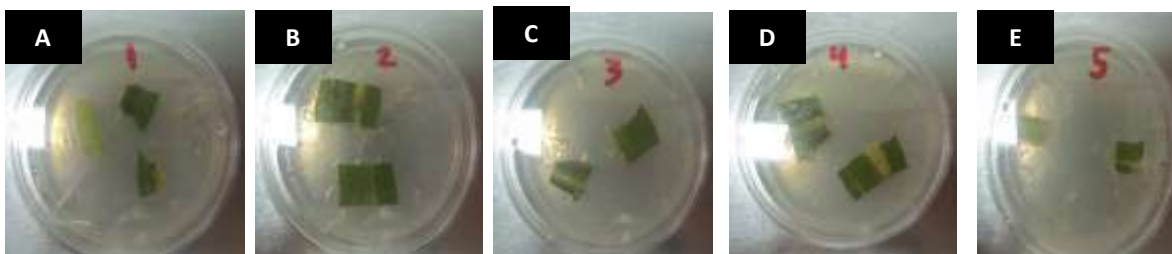
Después de la germinación, las plántulas fueron trasplantaron a tubos de crecimiento, los cuales contenían solución hidropónica. Se dejaron crecer durante 5 días más y se infectaron, con las cruza anteriormente utilizadas.

**Imagen 29.** Plántulas de maíz, para infección en sistema hidropónico



Una vez obtenidas las agallas en hojas, fueron sometidas al proceso de desinfección de, y se sembraron en medio MS por el envés, para mantener el flujo de nutrientes del medio hacía en interior del explante. El medio fue adicionado con hygromicina 150 µg/ml. Los explantes sembrados se muestran en la siguiente imagen.

**Imagen 30.** Hojas de maíz, con formación de agallas, sembradas en medio MS (A)- Control negativo (Sin infectar), (B)- 518/521, (C)- Trt1-1/Trt1-53, (D)- Trt1-2/Trt1-53, (E)- Control negativo (Sin infectar)



Los explantes de agallas de hoja de maíz murieron, con la condición de Hyg 150µg/µl Para evitar esta alta mortalidad se volvieron a usar agallas de tallo, cultivadas en condiciones axénicas, pero con una cantidad de esporidias igual al ensayo anterior. Para este ensayo, se decidió probar las siguientes cruza, que se muestran en la tabla 23.

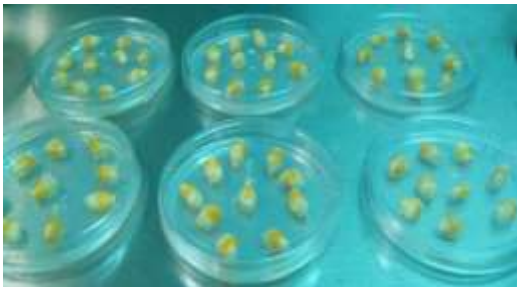
**Tabla 22.** Nuevas cruza de *U.maydis*, para infección en sistema *in vitro*.

Cruza
518x521
518xHDA-1E
518xHDA-4E
521xTrt1-53

Se decidió trabajar con estas cruces, para obtener la formación de telioesporas dentro de la planta y al mismo tiempo poder micropropagar callos de maíz infectados con estas cepas, ya que la infección *in planta* de las cruces heterocigotas WT X  $trt^-$  no necrosa los tejidos.

Se trabajó con 60 semillas de maíz MCS-200, las cuales fueron sometidas, por el proceso de desinfección y posteriormente puesta en medio agar-agua para su germinación. A los 3 días incubadas en la oscuridad, las plántulas germinadas se transfirieron a solución hidropónica para continuar con su crecimiento.

**Imagen 31.** Semillas de maíz sembradas en medio agar-agua, para su germinación



**Imagen 32.** Semillas de maíz germinadas en medio agar-agua.



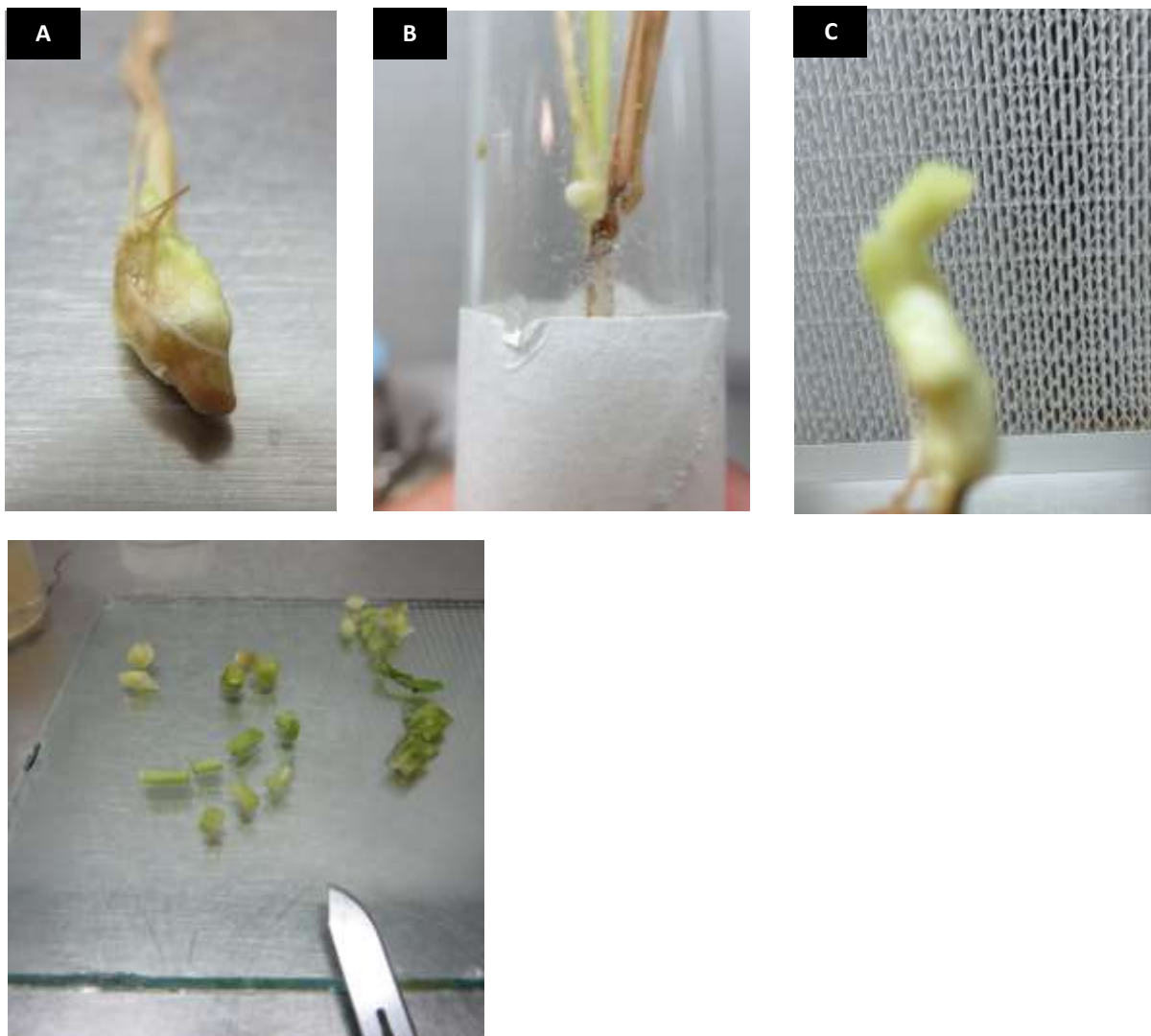
Después del 5 día de crecimiento fueron infectadas, con forme a el protocolo de infección de plantas, con esporidias de cada una de las cepas. Se observó el desarrollo de estas.

**Imagen 33.** Plántulas de maíz, listas para la infección con *U.maydis* en un sistema *in vitro*.



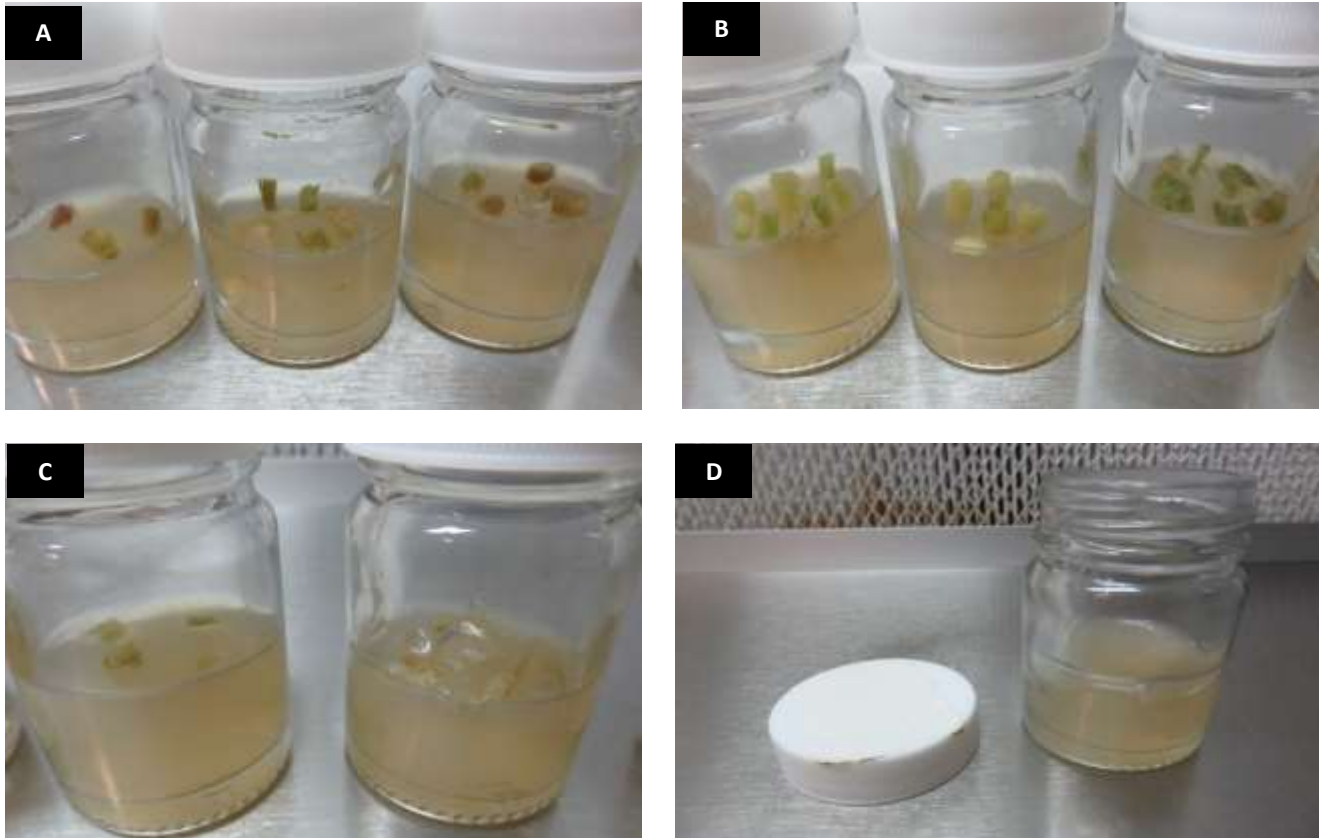
Se hizo la infección de las plántulas y se obtuvieron agallas, las cuales posteriormente se sometieron al proceso de desinfección de explantes. En las siguientes imágenes, se muestran las agallas utilizadas, para la realización de este ensayo.

**Imagen 34.** Agallas formadas en sistema *in vitro*, (A)- 521xTrt1-53, (B)- 518xhda1-1E, (C)- 518xhda1-4E, (D)- Tamaño de corte de explante para sembrar.



Una vez desinfectados los explantes, se cortaron en trozos de aproximadamente medio centímetro sobre una superficie de vidrio estéril, y con material igualmente estéril, se cortaron explantes de agallas presentes en el tallo y una pequeña parte de agallas de hoja y se sembraron en medio MS, los explantes, se colocaron en una caja de crecimiento, que se encontraba aislada del ambiente, y ubicada en una ventana que estuviera muy iluminada por luz solar, esta caja de crecimiento presenta orificios, para poder dejar pasar la luz durante el día y así simular, los fotoperiodos de luz y oscuridad (~12 h luz y 12 h oscuridad), al mismo tiempo tener las condiciones naturales de día y noche (~16 – 26°C). A continuación se muestran las imágenes de la siembra de los explantes.

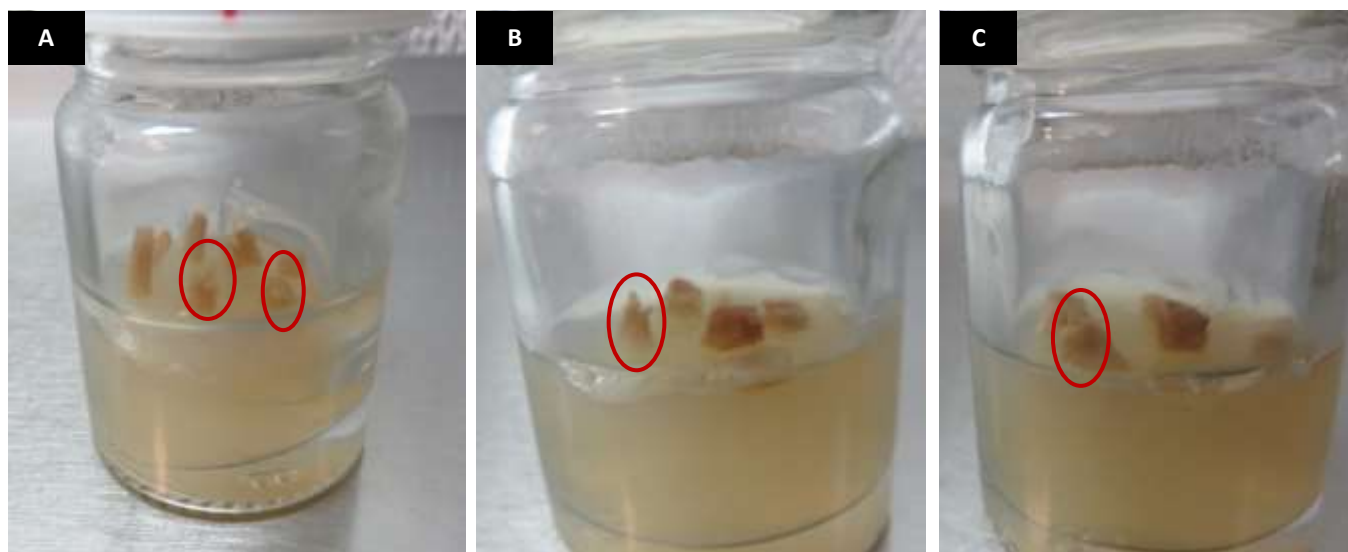
**Imagen 35.** Explantes sembrados en medio MS (A)- 518xhda1-1E, (B)- 521xTrt1-53, (C)- 518xhda1-4E, (D)- Control de esterilidad.



Se observó la evolución de los explantes diariamente, es importante destacar que, durante el periodo de desarrollo de estos explantes, se cerró totalmente el frasco en donde se encontraban, tomando solo un tiempo diariamente, para abrirlos en la campana y que pudiera existir una buena ventilación adentro del frasco y al explante.

Al término del 4 día algunos explantes procedentes de agalla de hojas, se secaron, pero los demás explantes se permanecieron en perfectas condiciones, Al término del 6 día, se observaron una serie de brotes en la parte superior de los explantes de la cruz 521/Trt1-53 solamente, las imágenes se muestran a continuación.

Imagen 36. Desarrollo de explantes (A-C)- cruza 521xTrt1-53.



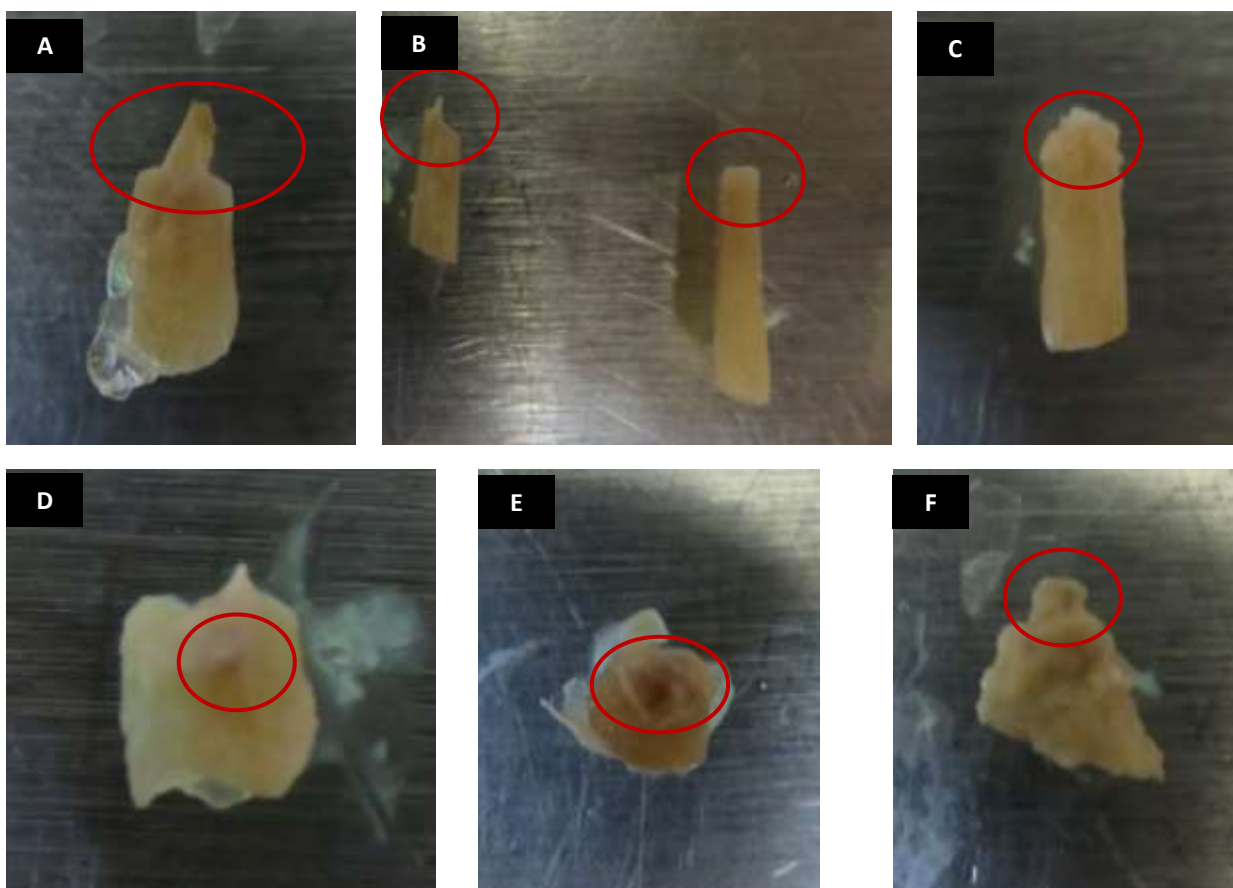
Como se observa en las imágenes anteriores, al 6 día ya existía la formación de brotes en la parte superior del explante, y lo más importante, es que no se encontraba contaminado por algún agente externo, como los que se presentaron en los ensayos anteriores. Se dejaron seguir creciendo, y al término del 8 día, se observó un crecimiento mayor en la parte superior de los explantes, por encima de los nuevos brotes que se habían obtenido, el cual inmediatamente se identificó por siembra en placa, de una muestra del crecimiento observado y se comprobó que este era *U.maydis*, en esta ocasión el crecimiento no era alrededor de la planta y no se comportaba de manera patógena, debido a que el nuevo brote continuaba con su crecimiento normal, mientras que el hongo seguía creciendo solamente en la parte superior de la planta.

Esto es muy importante, debido a que ahora se tienen las evidencias suficientes, para afirmar que no se está comportando de manera patógena y que el hongo no proviene de alguna contaminación, o del exceso de esporidias en la planta al momento de la infección, sino que emergen del tejido interno de la planta, y se presentó solamente en los nuevos brotes de los explantes y no en toda la planta, como se había visto en los ensayos anteriores. Y lo importante, es que no está matando al explante, si no que crecen juntos, como lo reportado en la literatura, en donde se tiene que las esporidias apareadas desarrollando una relación mutualista con el hospedero, en este caso en particular con *A.thaliana*, y en este trabajo posiblemente con maíz. Sin duda alguna, faltan realizar una serie de experimentos, y determinar si crece la cepa silvestre o la mutante para poder corroborar esta teoría.

Estas observaciones muestran que crecen esporidias y esto nos está indicando dos posibilidades: 1.-Que dentro de la planta el hongo continúe proliferando como esporidia, e invada tejidos aún a una distancia relativamente grande desde el sitio de punción (~ 5-10 cm), y que coexista con la fase miceliar la cual haya provocado el desarrollo del tumor bajo esas condiciones. 2.- Que las esporidias sean incapaces de aparearse (improbable por experimentos previos de obtención de progenie) y generen tumores (improbable por trabajos descritos en la literatura).

En las siguientes imágenes, se observa el desarrollo del hongo, el cual se mencionó anteriormente.

**Imagen 37.** Desarrollo brotes junto con el hongo en los explantes (A-F)- cruza 521xtrt1-53.



Los explantes y sus brotes, fueron fijados en solución fijadora para hongos, y se almacenaron, en refrigeración para posteriormente realizar ensayos de microscopía y poder esclarecer las posibles teorías del fenómeno que está ocurriendo dentro de la planta y que está provocando el crecimiento del explante y al mismo tiempo del hongo.

Se tomaron muestras de estos crecimientos y se sembraron en placas con medio yeps, posteriormente, se observaron al microscopio y no se encontró alguna contaminación, como previamente se ha mencionado. En las siguientes imágenes, se observan las telioesporas observadas al microscopio.

**Imagen 38.** Esporidias observadas al microscopio de la cruz 521xtrt1-53.



## 9.- Conclusiones.

Con base en los resultados presentados en este trabajo se pueden concluir algunas cosas derivadas de cada objetivo. Tenemos para el objetivo 1, que se presentaron eventos de haploinsuficiencia en cruzas heterocigotas de las mutantes *hda1* de *U.maydis*, pero no representaron un riesgo de consideración para el desarrollo de este trabajo, debido a que el porcentaje de infección se vio reducido en ~50%, lo cual dio viabilidad al proyecto y dejando información valiosa para futuros ensayos similares al realizado en este trabajo. Para el objetivo 2 se logró obtener dobles mutantes *trt1::hda1Δ*, las cuales presentaron velocidades de crecimiento muy interesantes, debido a que existe diferencia significativa respecto a las parentales y el fenotipo de estas mutantes fue distinto a las cepas WT como ya se describió anteriormente. En el objetivo 3 se obtuvieron resultados bastante interesantes respecto al tipo de telómero que estas mutantes están presentando y el cambio en estos, que aparentemente está ocurriendo conforme al paso de las generaciones, este fenómeno de intercambio de tipo de telómero es interesante podría ser la base para continuar con la línea de investigación. En el objetivo 4 se obtuvieron resultados pre liminares que fueron bastante interesantes, debido a que posiblemente exista un aumento en la cantidad de transcritos para *Rad51*, dejando abierta la posibilidad, de que exista algo similar al modelo de *S.cerevisiae* y aunado a los resultados del objetivo 3, se pueda definir el telotipo en estas mutantes de *U. maydis*, para lo cual es necesario realizar ensayos más sensibles para poder corroborar esta posibilidad. Por ultimo para el objetivo 5 se obtuvieron datos verdaderamente interesantes, debido a que abre la posibilidad de poder realizar cultivo de tejidos infectados con *U. maydis* de forma *in-vitro*, lo cual representaría un tema de interés comercial, debido a la importancia de este hongo a nivel científico y económico, aunado a que falta realizar ensayos de

microscopia y poder obtener mayor información acerca de estos resultados, queda como antecedente para investigaciones futuras.

Como conclusión general podemos decir que se logró obtener dobles mutantes telomerasa negativa e histonodesacetilaza negativa, las cuales nos permitió generar un primer acercamiento hacia las vías ALT de mantenimiento de los telomeros en estas mutantes, dando la pauta para trabajos posteriores a este y poder esclarecer perfectamente los mecanismos involucrados en las vías ALT. Al mismo tiempo, se sentaron las bases para el posible desarrollo de cultivos *in vitro* de explantes vegetales y su desarrollo con *U.maydis* de forma *in-vitro*. Debido a que por el momento, no se sabemos con exactitud si hay crecimiento de tejido vegetal, o del explante en sí.

## 10.- Perspectivas

- Corroborar los efectos observados de la estructura telomérica en estos primeros resultados, por hibridación y qRT-PCR
- Esclarecer los mecanismos de mantenimiento de los telomeros en las dobles mutantes.
- Definir el telotipo de las dobles mutantes en *U.maydis*.
- Corroborar mediante microscopia, si existe crecimiento de tejido vegetal o del explante.

## 11.- Bibliografía.

- A. Killian , David D.L. Bowtell, Helen E. Abud, Gary R. Hime, Deon J. Venter, Paul K. Keese, Emma L. Duncan, Roger R.Reddel, Richard A. Jefferson. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. Human molecular genetics, Oxford University Press J.6 (1997) 2011 -2019.20011-2019
- A.J. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, A.B. van Kuilenburg, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, Biochem. J. 370 (2003) 737–749.
- Banuett F. “Ustilago maydis, the delightful blight” Trends Genet 8 (1992) 174-180.
- Banuett F. Pathogenic Development in Ustilago maydis, a progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. Heinz D Osiewacs. Molecular Biology of Fungal Development (2002) pp. 340-369.
- Banuett. F, I. Herskowitz. Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, Ustilago maydis. Fungal Genet. Biol. 37(2002):149–170.
- Blackburn. EH, Szostak. JW. Molecular structure of centromeres and telomeres. Ann Rev Biochem (1984); 53:163-94.
- Blackburn. EH. Switching and signaling at the telomere. Cell 106 (2001) 661–673.
- Brosch, G., Loidl, P, Graessle. S. “Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi” FEMS Microbiol Rev, 32(2008), 409-439.
- Castillo A Practicas de biotecnología vegetal 2004.
- Cong YS, Bacchetti S. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. J BiolChem 275 (2000):35665–35668.
- Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. Mutat Res (1996);366:45-63.
- Davey J. Fusion of fission yeast. Yeast 14(1998) 1529–1566.
- Denisse IC. “OBTENCIÓN DE UNA MUTANTE INTERRUMPIDA EN EL GEN hda1 de Ustilago maydis”. Tesis. Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas (2013) Puebla, Pue.
- Gary A. Ulaner, Ji-Fan Hu, Thanh H. Vu, Linda C. Giudice, and Andrew R. Hoffman. Telomerase Activity in Human Development Is Regulated by Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Transcription and by Alternate Splicing of hTERT Transcripts, Cancer Res (1998);58:4168-4172.
- Gary A. Ulaner, Ji-Fan Hu, Thanh H. Vu, Linda C. Giudice, Andrew R. Hoffman. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development (2001).
- Gonzáles, J, Domínguez, A., Rosas, R. y Cols. “Isolation and Molecular Analysis of Umhda2 a Gene Encoding a Histone Deacetylase from Ustilagomaydis” DNA Sequence, 15-1 (2004), 44-50.

- Gregoret, Y.M. Lee, H.V. Goodson, Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 17–31.
- Greider, C. W, Blackburn. E. H. *Cell* (1987) 51, 887- 898.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, (1989) 337,331-337.
- Greider, E.H. Blackburn, Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *tetrahymena* extracts, *Cell* 43 (1985) 405–413.
- Jung AR, Yoo JE, Shim YH, Choi YN, Jeung HC, Chung HC, Rha SY, Oh BK, Increased alternative lengthening of telomere phenotypes of telomerase-negative immortal cells upon trichostatin—a treatment. Department of Bioscience and Biotechnology, Brain Korea 21 Division of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul (2013), 143-701.
- Kronstad JW Mining the genome of the biotrophic fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*45 suppl (2008) 1:S1–S2.
- Kyo. Risk factors associated with complication following laparoscopy-assisted Gastrectomy for gastric cancer: A Large-Scale Korean Multicenter Study. (Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchondong Seodaemunku, Seoul (2008). 120-752.
- Lee, I., Hwan, J., Keats, E. “HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production” *Fungal Genet Biol*, 46 10 (2009), 782-790.
- Lingner, J., Hughes, T, Shevchenko, A. “Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase” *Science*, 76 (1997) (5312), 561-567.
- Ludwig-MJ JD Cohen. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *physiologia plantarum* 115 (2002): 320–329.
- Makovets S, Tanya L, William, Elizabeth Blackburn. The telotype defines the telomere state in *Saccharomyces cerevisiae* and is inherited as a dominant Non-Mendelian characteristic in cells lacking telomerase (2007).
- Marks, P. and Xu, W. “Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy” *J Cell Biochem.* 107 4 (2009), 00-608.
- McClintock. The stability of broken ends of chromosomes in *Zeamays*, *genetics* 41 (1941) 234–282.
- McEachern MJ, Haber JE Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. 75 (2006):111-35.
- Muller. The remaking of chromosomes, the collecting net-Woods Hole 13 (1938) 181–198.
- O.H. Lee, H. Kim, Q. He, H.J. Baek, D. Yang, L.Y. Chen, J. Liang, H.K. Chae, A. Safari, D. Liu, Z. Songyang, Genome-wide YFP fluorescence complementation screen identifies new regulators for telomere signaling in human cells, *Mol. Cell Proteomics* 10 (2011) M110001628
- Olaf. W, Hedwig E. Deubzer, Till Milde, Ina Oehme. HDAC family: What are the cancer relevant targets? Clinic for Pediatric Oncology, Hematology and

Immunology, University Hospital Heidelberg, ImNeuenheimer Feld 280, (2008) 69120.

- Osterhage, J. L., Talley, J. M., and Friedman, K. L. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13,(2006) 720-728.
- Palm, T. de Lange, How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 301–334
- Ralph D, JAN A. L. Van Kan, Zacharias A. Pretorius, Kim E. Hammond-Kosack, Antonio Di Pietro, D. Spanu, Jason J. Rudd, Marty Dickman, Regine Kahman, Jeff Ellis, Gary D. Foster, “The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology” *Molecular plant pathology*.Review 2012.
- Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G. “The histone deacetylase Hda1 from *Ustilagomaydis* is essential for teliospore development” *Molecular Microbiology*, 46 4 (2002), 1169-1182.
- Ruijter JM, Verhoeven JW, Van der Linden JA, Cune MS, Terlou M. Image processing and analysis program for measurement of bone density changes in reference and follow-up standardized extraoral oblique lateral cephalometric radiographs of the mandible 6 (2003):379-84.
- Ruiz Herrera J. *Ustilago maydis: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico*, 2008.
- Sánchez A,P, Guzman, P. “Predicted elements of telomere organization and function in *Ustilago maydis* “ *Fungal Genetics and Biology*, (2008) 1-9.
- Sánchez Alonso P, Guzmán P. Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis*, RecQ-like Helicase Motifs at telomeric regions. Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, centro de investigación y de estudios avanzados del IPN, unidad Irapuato (1997).
- Sánchez Alonso P, Guzmán P. Predicted elements of telomere organization and function in *Ustilago maydis*. CINVESTAV Irapuato, BUAP (2008).
- Shcherbakova, D. M., Zvereva, M. E., Shpanchenko, O. V., and Dontsova, O. A. *Mol. Biol. Moscow* 40, (2006) 1-15.
- Sinclair, C.S., Richmond, R.H., Ostrander, G.K. “Characterization of the telomere regions of scleractinian coral *Acropora surculosa*” *Genética*, (2007), 129,227-223.
- Smith PM, CA Atkins. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128 (2002): 793-802.
- Steinberg Gero, Perez M.J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. Max Plank Institut (2007).
- Szostak, E.H. Blackburn, Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors, *Cell* 29 (1982) 245–255.
- T. de Lange, How telomeres solve the end-protection problem, *Science* 326 (2009) 948–952.
- Traut, W., Szczepanowski, M., Vitkova, M. “The telomere repeat motif of basal Metazoa” *Chromosome Res.* 15, (2007) 371-382.
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts 18 (1998):4168-72.

- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development 5 (2001):644-9.
- Wahlström R, Rahikainen J, Kruus K, Suumākki A. Cellulose hydrolysis and binding with *Trichoderma reesei* Cel5A and Cel7A and their core domains in ionic liquid solutions 111 4 (20013):726-33
- Xie BT, Ji GZ, Kong QR, Mao J, Shi YQ, Liu SC, Wu ML, Wang J, Liu L, Liu ZH, Telomere lengthening by trichostatin A treatment in cloned pigs. Laboratory of Embryo Biotechnology, College of life science, Northeast Agricultural University, Harbin (2013) 150030,
- Yang YL, Huang PH, Chiu HC, Kulp SK, Chen CS, Kuo CJ, Chen HD, Chen CS, Histone deacetylase inhibitor AR42 regulates telomerase activity in human glioma cells via an Akt-dependent mechanism, Institute of Basic Medical Sciences, College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, (2013).
- Yao, E. Blackburn, J.G. Gall, Amplification of the rRNA genes in tetrahymena, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43 (Pt 2) (1979) 1293–1296.

## 12.- Anexos.

Calidad de DNA de dobles mutantes a 0, 50 y 100 generaciones.

- **1E/Trt1-53.**

T0	260nm	280nm	260/280	50G	260 nm	280nm	260/280	100 G	260 nm	280nm	260/280
1	.170	.093	1.85	1	2.165	1.022	2.05	1	.630	.320	1.96
2	.130	.072	1.80	2	.678	.340	1.99	2	1.288	.641	2.00
3	.197	.105	1.87	3	1.370	.676	2.02	3	.502	.261	1.92
4	.245	.134	1.82	4	.368	.188	1.95	4	2.60	1.287	2.02
6	.080	.044	1.81	6	1.737	.852	2.03	6	2.541	1.269	2.00

- **4E/Trt1-53.**

T0	260nm	280nm	260/280	50 G	260 nm	280nm	260/280	100G	260 nm	280nm	260/280
1	.622	.322	1.93	1	1.215	.601	2.02	1	.722	.370	1.95
2	.315	.169	1.86	2	1.270	.620	2.04	2	2.335	1.137	2.05
3	.317	.171	1.85	3	0.620	.311	1.99	3	2.294	1.116	2.05
4	.268	.148	1.81	4	0.650	.333	1.95	4	.413	.211	1.95
7	.559	.284	1.96	7	1.171	.584	2.00	7	.651	.330	1.97

Digestiones de DNA de dobles mutantes, con la enzima *Pst1*.

- **Tiempo 0.**

1E/Trt1-53	Buffer O	<i>Pst1</i>	DNA (15µg)	H <sub>2</sub> O	Vf -200 µL
1	20	1.5	4.82	173.68	200
2	20	1.5	4.52	168.98	200
3	20	1.5	9.46	169.04	200
4	20	1.5	11.19	167.31	200
7	20	1.5	5.36	173.14	200

4E/Trt1-53	Buffer O	<i>Pst1</i>	DNA (15µg)	H <sub>2</sub> O	Vf -200 µl
1	20	1.5	17.04	161.46	200
2	20	1.5	23.07	155.43	200
3	20	1.5	15.22	163.68	200
4	20	1.5	12.24	166.26	200
6	20	1.5	37.5	141.00	200

- Generación 50.

<b>1E/Trt1-53</b>	<b>Buffer O</b>	<b>Pst1</b>	<b>DNA (15µg)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Vf -200 µL</b>
<b>1</b>	20	1.5	2.46	176.04	200
<b>2</b>	20	1.5	2.36	176.14	200
<b>3</b>	20	1.5	4.83	173.67	200
<b>4</b>	20	1.5	4.61	173.89	200
<b>7</b>	20	1.5	2.56	175.94	200

<b>4E/Trt1-53</b>	<b>Buffer O</b>	<b>Pst1</b>	<b>DNA (15µg)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Vf -200 µL</b>
<b>1</b>	20	1.5	1.42	177.08	200
<b>2</b>	20	1.5	4.42	182.92	200
<b>3</b>	20	1.5	2.18	180.68	200
<b>4</b>	20	1.5	8.15	170.05	200
<b>6</b>	20	1.5	1.72	176.78	200

- Generación 100.

<b>1E/Trt1-53</b>	<b>Buffer O</b>	<b>Pst1</b>	<b>DNA (15µg)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Vf -200 µL</b>
<b>1</b>	20	1.5	4.15	174.35	200
<b>2</b>	20	1.5	1.28	177.22	200
<b>3</b>	20	1.5	1.30	177.2	200
<b>4</b>	20	1.5	7.26	171.24	200
<b>7</b>	20	1.5	4.65	173.85	200

<b>4E/Trt1-53</b>	<b>Buffer O</b>	<b>Pst1</b>	<b>DNA (15µg)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Vf -200 µL</b>
<b>1</b>	20	1.5	4.76	173.74	200
<b>2</b>	20	1.5	2.32	176.18	200
<b>3</b>	20	1.5	5.97	172.53	200
<b>4</b>	20	1.5	1.15	177.35	200
<b>6</b>	20	1.5	1.18	177.32	200

- Digestiones DNA cepas parentales.

<b>4E/Trt1-53</b>	<b>Buffer O</b>	<b>Pst1</b>	<b>DNA (15µg)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Vf -200 µL</b>
<b>518</b>	20	1.5	2.27	176.23	200
<b>521</b>	20	1.5	2.29	176.21	200
<b>1E</b>	20	1.5	5.36	173.14	200
<b>4E</b>	20	1.5	17.85	160.65	200
<b>Trt1-53</b>	20	1.5	6.451	172.04	200

- **Concentración de DNA de cepas parentales.**

<i>Cepa</i>	<i>260 nm</i>	<i>µg/µL</i>
<b>521</b>	1.319	6.595
<b>518</b>	1.307	6.535
<b>1E</b>	0.559	2.795
<b>4E</b>	0.168	0.84
<b>Trt1-53</b>	0.465	2.325

- **Concentración de DNA de dobles mutantes a 50 y 100 G (Generaciones).**

T0				50 G				100 G			
1E/Trt1-53 (µg/µL)		4E/Trt1-53 (µg/µL)		1E/Trt1-53 (µg/µL)		4E/Trt1-53 (µg/µL)		1E/Trt1-53 (µg/µL)		4E/Trt1-53 (µg/µL)	
<b>1</b>	3.11	<b>1</b>	.88	<b>1</b>	6.035	<b>1</b>	10.52	<b>1</b>	3.61	<b>1</b>	3.15
<b>2</b>	1.575	<b>2</b>	.65	<b>2</b>	6.35	<b>2</b>	3.39	<b>2</b>	11.675	<b>2</b>	6.44
<b>3</b>	1.585	<b>3</b>	.985	<b>3</b>	3.1	<b>3</b>	6.85	<b>3</b>	11.47	<b>3</b>	2.51
<b>4</b>	1.34	<b>4</b>	1.225	<b>4</b>	3.25	<b>4</b>	1.84	<b>4</b>	2.065	<b>4</b>	13
<b>7</b>	2.795	<b>6</b>	.4	<b>7</b>	5.85	<b>6</b>	8.68	<b>7</b>	3.255	<b>6</b>	12.705