



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

“Caracterización del *locus ter1* y perfil de expresión transcripcional de la cepa parental 518 y mutantes $\Delta ter1$ de *Ustilago maydis*”

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

M. C. Juan Antonio Sanpedro Luna

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Patricia Sánchez Alonso

PUEBLA, PUE.

JUNIO, 2023



BUAP

Puebla, Pue. a 18 de mayo 2023.

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

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

“Caracterización del locus *ter1* y perfil de expresión transcripcional de la cepa parental 518 y mutantes *ter1* de *Ustilago maydis*”


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


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Candelario Vazquez Cruz


D.C. Leticia Vega Alvarado


D.C. Verónica Vallejo Ruiz


D.C. Verónica Quintero Hernández

Índice General

RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Telómeros	1
1.1.1. Secuencias subteloméricas	3
1.2. Telomerasa.....	6
1.2.1. Subunidad TERT.....	8
1.2.2. Subunidad TER	10
1.2.2.1 TER: Transcripción y biogénesis	13
1.3. <i>Ustilago maydis</i>	15
1.3.1. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	16
1.3.2. <i>U. maydis</i> como organismo modelo.....	18
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.1.1. Objetivos particulares.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Obtención de las mutantes y caracterización fenotípica	25
6.1.1. Cepas y medios de cultivo.....	25
6.1.2. Plásmidos	25
6.1.3. Diseño de oligonucleótidos	26
6.1.4. Diseño de la secuencia de interrupción para <i>terI</i>	27
6.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
6.1.6. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos de ADN	28
6.1.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción	28
6.1.8. Ligación de los fragmentos de restricción en el vector de clonación.....	29
6.1.9. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	29
6.1.10. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	29
6.1.11. Extracción de ADN plasmídico.....	30

6.1.12. Extracción de ADN Total de <i>U. maydis</i>	30
6.1.13. Purificación y cuantificación de ADN	31
6.1.14. Transformación de <i>U. maydis</i>	32
6.1.15. Análisis de la morfología colonial y celular de <i>U. maydis</i>	32
6.1.16. Cinética de crecimiento de <i>U. maydis</i>	33
6.1.17. Análisis del fragmento terminal de restricción en <i>U. maydis</i>	33
6.1.18. Ensayos de infección en plantas de maíz con <i>U. maydis</i>	34
6.2. Análisis Bioinformáticos.	34
6.2.1. Búsqueda de secuencias candidatas del gen <i>ter1</i>	34
6.2.2. Análisis <i>In silico</i> de loci análogos <i>ter1</i> en Ustilaginales.....	35
6.2.3. Extracción de ARN y preparación de librerías de RNA-Seq	35
6.2.4. Filtrado y análisis de calidad de las lecturas de RNA-Seq.....	37
6.2.5. Cuantificación de los transcritos y análisis de expresión diferencial de la cepa silvestre 518 y mutantes <i>ter1::hph</i> de <i>U. maydis</i>	37
6.2.6. Anotación y clasificación de los transcritos expresados diferencialmente en la cepa silvestre 518 y mutantes <i>ter1::hph</i> de <i>U. maydis</i>	38
7. RESULTADOS	40
7.1. Identificación de loci candidatos <i>ter1</i>	40
7.2. Análisis <i>In silico</i> del locus <i>ter1</i> en Ustilaginales	40
7.3. Ensamblaje de la secuencia de interrupción para <i>ter1</i>	45
7.4. Obtención de mutantes <i>ter1::hph</i>	48
7.5. Análisis fenotípico de las mutantes <i>ter1::hph</i>	51
7.6. Análisis del fragmento terminal de restricción	53
7.7. Ensayos de infección en plantas de maíz.....	54
7.8. Control de calidad de las lecturas de RNA-Seq.....	56
7.9. Ensamblaje del transcriptoma de la fracción nuclear y análisis de calidad	57
7.10. Representación de las lecturas	59
7.11. Análisis de calidad de los datos y expresión diferencial	60
7.12. Análisis de los transcritos reconstruidos de <i>ter1</i> de la fracción nuclear	64
7.13. Análisis transcripcional de las mutantes <i>ter1</i>	67
8. DISCUSIÓN.....	68
8.1. Identificación del gen <i>ter1</i>	68

8.2. Caracterización del transcrito <i>terI</i>	69
8.3. Interrupción de <i>terI</i> en la cepa 518 de <i>U. maydis</i>	70
9. CONCLUSIONES.....	73
10. PERSPECTIVAS.	74
11. REFERENCIAS	75
ANEXOS.....	89
Anexo A.....	89
Anexo B	95
Anexo C	122
Publicación.....	122

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de los telómeros en mamíferos y levadura.	3
Figura 2. Organización del extremo cromosomal en <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 3. Dominios estructurales de la subunidad catalítica de la telomerasa de vertebrados.	9
Figura 4. Estructura secundaria de la subunidad de ARN de la telomerasa de ciliados, vertebrados y levaduras.	11
Figura 5. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	17
Figura 6. Mapa de sintenia del <i>locus ter1</i> en especies de Ustilaginales.	41
Figura 7. Motivos conservados dentro del <i>locus ter1</i>	43
Figura 8. Plegamiento de dominios estructurales conservados en especies de Ustilaginales.	44
Figura 9. Localización genómica de la secuencia intergénica <i>ter1</i> y estrategia de interrupción del gen <i>ter1</i> en la cepa 518 de <i>U. maydis</i>	45
Figura 10. Electroforesis de los elementos del casete de interrupción y perfil de restricción de las construcciones pTer-5' y pTer-3'.	46
Figura 11. Análisis de restricción de la construcción pTerSub5'.	47
Figura 12. Análisis de restricción de la construcción pTer1.	48
Figura 13. Análisis de restricción de la secuencia de interrupción para <i>ter1</i> derivada de pTer1.	49
Figura 14. Ensayos de PCR para confirmar la correcta integración de la secuencia de interrupción del <i>locus ter1</i> por HR.	50
Figura 15. Alteraciones fenotípicas producidas por la interrupción de <i>ter1</i> en <i>U. maydis</i> . .	52
Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa WT 518 y mutantes <i>ter1::hph</i>	53
Figura 17. Análisis del fragmento terminal de restricción de la cepa WT 518 y mutantes <i>ter1::hph</i>	54
Figura 18. Desarrollo de la infección en plantas de maíz causada por cruza silvestres y cruza heterocigotas <i>ter1⁺/ter1⁻</i> de <i>U. maydis</i>	55
Figura 19. Distribución de las cuentas normalizadas (TMM y CPM) de las librerías de RNA-seq de la cepa 518, mutantes <i>ter1::hph</i> y de la fracción nuclear de la cepa 521 de <i>U. maydis</i>	61
Figura 20. Gráficas MDS de las librerías de RNA-seq de la cepa 518, mutantes <i>ter1::hph</i> y de la fracción nuclear de la cepa 521 de <i>U. maydis</i>	62

Figura 21. Diagramas de Venn y distribución de los DEGs de células haploides de <i>U. maydis</i> de la cepa silvestre 518 y mutantes <i>ter1::hph</i>	63
Figura 22. Diagramas de Venn y distribución de DEGs identificados entre los transcriptomas de la fracción nuclear poliadenilada y la fracción nuclear total de la cepa silvestre 521 de <i>U. maydis</i>	64
Figura 23. Análisis estructural y funcional de las lecturas de RNA-seq del locus <i>ter1</i> de <i>U. maydis</i>	65

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas de microorganismos utilizados en este estudio.....	25
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.....	25
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	26
Tabla 4. Librerías de RNA-seq y control de calidad de las muestras de la cepa silvestre 518 y mutantes <i>ter1::hph</i>	57
Tabla 5. Librerías de RNA-seq y control de calidad de las muestras de la fracción nuclear de la cepa silvestre 521.	57
Tabla 6. Estadísticas y puntuación del ensamblaje obtenido con TransRate para el transcriptoma de las fracciones nucleares de la cepa WT-521.	58
Tabla 7. Porcentajes de alineamiento con Bowtie 2 de las librerías utilizadas para el análisis del transcriptoma de la cepa silvestre 518 y mutantes <i>ter1::hph</i>	59
Tabla 8. Porcentajes de alineamiento con Bowtie 2 de las librerías utilizadas para el ensamblaje del transcriptoma de las fracciones nucleares de la cepa silvestre 521.	60

Lista de Abreviaturas

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
A	Absorbancia
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARS	Secuencia de replicación autónoma
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
BSA	Albúmina de suero bovino
CaCl ₂	Cloruro de calcio
cbp	Cantidad bastante para
CDS	Secuencia codificante
CH ₃ CO ₂ K	Acetato de potasio
CTE	Extensión carboxilo terminal
DDR	Repuesta al daño del ADN
DEGs	Genes expresados diferencialmente
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-infección
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EST	Marcador de secuencia expresada
g	Gramo
G	Guanina
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
kb	Kilobases
l	Litro
LB	Luria Bertani
LiCl	Cloruro de litio
lncRNA	ARN largo no codificante
M	Molar
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro

mM	Milimolar
MnCl ₂	Cloruro de manganeso
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico
MSA	Alineamiento múltiple de secuencias
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
RbCl	Cloruro de rubidio
RNAi	ARN interferente
RNP	Ribonucleoproteína
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
scaRNA	ARN pequeño de cuerpo de Cajal
SCS	Sorbitol-Citrato de sodio
SDS	Dodecilsulfato sódico
snoRNA	ARN pequeño nucleolar
snRNA	ARN pequeño nuclear
STC	Sorbitol-CaCl ₂ -Tris-HCl
STE	Elemento de tallo terminal
T.E.	Tris-EDTA
TAS	Secuencias asociadas a telómeros
TBE	Elemento delimitador del templete
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
TEN	Dominio N-terminal esencial de la telomerasa
TER	ARN de la telomerasa
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa
TMG	2,2,7-trimetil guanosina
TPE	Efecto de posición del telómero
TRBD	Dominio de unión a ARN de la telomerasa
TRF	Fragmento terminal de restricción
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRR	Telomerase RNA Repeat
U	Unidad

U	Uracilo
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltio
V	Volumen

RESUMEN

La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad transcriptasa reversa que cataliza la síntesis de *novoo* del repetido telomérico en los extremos lineales de los cromosomas eucarióticos. Sus componentes centrales son la subunidad proteica TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) y la subunidad de ARN conocida como TER (*Telomerase RNA*). Hasta el momento se conoce con mucho detalle la importancia de la telomerasa para mantener los extremos de los cromosomas en varios organismos, tanto superiores como inferiores. La estructura y función de la subunidad proteica, que contrarresta la erosión de los telómeros, ha sido bien estudiada experimentalmente. En contraparte existen pocos estudios sobre la subunidad TER, sobre su participación en la regulación del complejo ribonucleoproteico y funciones extra-teloméricas, ya que es un componente lábil, escasamente conservado y poco abundante en la célula. Por lo que es imperativo identificar el gen de la subunidad TER y conocer todo lo relativo a la regulación de su expresión, los mecanismos asociados a su producción y a su activación. En este trabajo, mediante una estrategia de genómica comparativa, se identificó el gen *ter1* que codifica para la subunidad TER en el hongo dimórfico *Ustilago maydis*. Se obtuvieron mutantes nulas *ter1* que, mostraron un fenotipo senescente y alteraciones en la expresión de los genes de respuesta a la eliminación de la telomerasa que incluyen: genes relacionados al daño del ADN, genes de respuesta a estrés ambiental y genes subteloméricos. Interesantemente, en contraste a las mutantes del componente catalítico previamente reportadas, las mutantes *ter1* mostraron una mayor disminución de la viabilidad celular e incapacidad para completar el ciclo de vida. Este último caso como consecuencia de cambios en la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y patogénesis. Conjuntamente se identificó una novedosa vía de procesamiento para el gen *ter1* de *U. maydis* que se transcribe a partir del gen codificante *UMAG_03168*. Por su parte, los resultados de los ensayos de infección en plantas de maíz y análisis de expresión diferencial, sugieren la participación de *Ter1* en la vía de señalización mediada por el regulador maestro *Rbf1*, demostrando por primera vez en *U. maydis* que el gen *ter1* posee funciones adicionales al mantenimiento del telómero, por lo que *U. maydis* se consolida como organismo modelo para continuar con el estudio evolutivo estructural y funcional de TER y para profundizar en el proceso de regulación de su expresión transcripcional y postranscripcional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Telómeros

Los telómeros son complejos núcleoproteicos que se localizan en los extremos de los cromosomas eucarióticos lineales que actúan como capucha protectora para prevenir su reconocimiento como rupturas de doble cadena por la maquinaria de repuesta al daño del ADN (DDR) por lo que desempeñan un papel central en el mantenimiento de la integridad del genoma, al prevenir eventos de degradación y fusión de los extremos cromosomales (Blackburn, 1994; Cross et al., 1989). El ADN telomérico está conformado por motivos cortos arreglados en *tándem*, que se encuentran orientados en sentido 5' a 3' hacia la parte terminal del cromosoma que se extienden hasta formar una región de cadena sencilla rica en G (Figura 1A). Este repetido telomérico puede ser homogéneo en todos sus monómeros como en vertebrados $(TTAGGG)_n$ o componerse de variantes de un motivo como en *Saccharomyces cerevisiae* $T(G)_{2-3}(TG)_{1-6}$ (McEachern & Blackburn, 1994; Moyzis et al., 1988). Por otro lado, en eucariontes superiores el extremo monocatenario 3' del ADN telomérico se pliega sobre la doble cadena de ADN para formar media estructura de Holliday (bucle D) que permite el establecimiento del bucle telomérico o bucle-t (Figura 1B) que es estabilizado mediante la unión de proteínas asociadas a telómeros (Griffith et al., 1999). En vertebrados las proteínas que estabilizan esta estructura se denominan complejo shelterin, el cual está conformado por TRF1 (Telomeric Repeat Factor binding) y TRF2 que se unen directamente a la doble cadena del repetido telomérico para reclutar a TIN2 (TRF-Interacting Protein 2), TPP1 (Telomere Protection Protein 1) y Rap1 (Repressor/Activator Protein 1); y POT1 (Protection Of Telomeres 1) que se une a la cadena sencilla del colgante 3' y al bucle D en la estructura de bucle-t (de Lange, 2005; Palm & de Lange, 2008). A través de la regulación de la actividad de estos componentes se controla el acceso de los factores implicados en el mantenimiento de los telómeros y se previene la activación de la cascada de señalización mediada por ATM, en consecuencia, defectos en la función de los componentes resultan en alteraciones en homeostasis de los telómeros que puede conducir a senescencia y apoptosis (de Lange, 2005).

En contraste a vertebrados en levaduras no ocurre el plegamiento del extremo monocatenario sobre la doble cadena con apareamiento entre bases de ADN, en cambio se produce un plegamiento sobre las regiones subtelo méricas y mantenimiento de la estructura de bucle mediante interacciones proteína-proteína (Figura 1C), que involucra al complejo análogo denominado telosoma compuesto por Rap1, principal componente y con alta afinidad de unión a la cadena doble del repetido telomérico en este organismo; los reguladores negativos Rif1 y Rif2 (Rap1 Interacting Factors 1 y 2) reclutados por Rap1 que también se encarga de promover la unión del complejo de silenciamiento Sir (Silent Information Regulator, Sir2, Sir3 y Sir4), a través de la interacción con Sir3 y Sir4. Sir4 a su vez se asocia con Sir2 que es capaz de promover la desacetilación del extremo N-terminal de las histonas H3 y H4 lo que genera sitios de alta afinidad para la unión de Sir3 y Sir4, promoviendo nuevamente la unión de Sir2 que conduce a la extensión de la cromatina hipoacetilada, lo que da como consecuencia el silenciamiento reversible de los genes adyacentes a los telómeros, fenómeno conocido como efecto de posición del telómero (TPE) (Gottschling et al., 1990; Strahl-Bolsinger et al., 1997).

Adicionalmente, en la levadura el complejo CST (Cdc13/Stn1/Ten1) y el complejo Ku (Ku70/Ku80) participan en la replicación y protección de los telómeros. El complejo CST se asocia con el extremo 3' monocatenario y participa en la regulación de la replicación de los telómeros a través de la promoción de la síntesis de la cadena complementaria del repetido telomérico por medio del reclutamiento de la polimerasa α /primasa y la interacción con Est1 para el reclutamiento de la telomerasa (Pennock et al., 2001; H. Qi & Zakian, 2000). Mientras la presencia de este complejo en otros organismos, con variaciones en secuencia y función en ocasiones dispensables, sugiere contribuciones adicionales a los telómeros que continúan siendo exploradas (Rice & Skordalakes, 2016). El complejo Ku se une a la doble cadena del extremo telomérico y de manera independiente a su rol en la reparación de rupturas de ADN de doble cadena por recombinación no homóloga, protege a los telómeros de la degradación y recombinación, además de interactuar con el componente de ARN para promover su importación al núcleo y reclutamiento del complejo RNP hacia los telómeros (Fisher & Zakian, 2005).

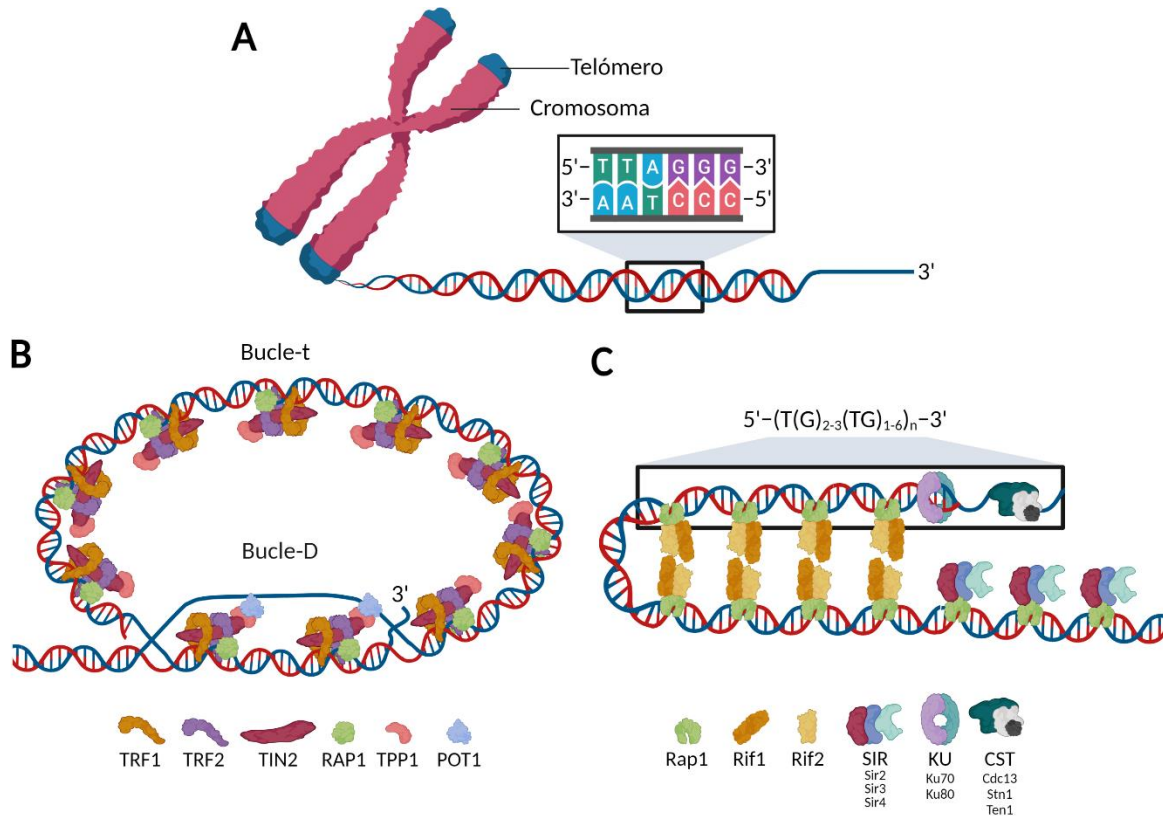


Figura 1. Estructura de los telómeros en mamíferos y levadura.

(A) Representación del extremo cromosomal. (B) Plegamiento del extremo cromosomal en humano. La región de cadena sencilla del repetido telomérico invade la doble cadena para formar un bucle de desplazamiento, el bucle telomérico y ocular el colgante de cadena sencilla de los factores de DDR. El complejo shelterin contribuye a la estabilización de la estructura. (C) Plegamiento del extremo cromosomal en levadura. El repetido telomérico se pliega sobre la región subteloamérica y la estructura es estabilizada mediante interacciones proteína-proteína. Rap1 se une a la doble cadena del repetido telomérico y recluta a Rif1 y Rif2 o al complejo Sir. El heterodímero Ku se une a la doble cadena mientras el complejo CST se une a la región de cadena sencilla.

1.1.1. Secuencias subteloáméricas

Las regiones subteloáméricas contienen elementos moderadamente repetitivos llamados secuencias asociadas a telómero (TAS, Telomere Associated Sequences), de secuencia y distribución polimórfica entre los cromosomas individuales, estos elementos se encuentran dispersos en el extremo cromosomal, como mosaicos de secuencias que pueden contener tramos de repetidos teloméricos o secuencias similares intercalados. En *S. cerevisiae* hay dos clases de estas secuencias llamadas elemento X y Y'.

Y' es un elemento altamente conservado localizado inmediatamente adyacente al repetido telomérico con la presencia de 0 a 4 copias arregladas en *tándem* y con dos tamaños posibles, Y' largo (6.7 kb) y Y' corto (5.2 kb) que se diferencian una de la otra por múltiples inserciones/deleciones pequeñas, además de contener dos ORFs largos, sobrelapados, uno de ellos capaz de codificar para una proteína relacionada con la familia de las helicasas RecQ. X es un elemento presente en todos los extremos cromosomales, este se encuentra menos conservado y su longitud varía desde 0.3 kb a 3.75 kb (Chan & Tye, 1983; Louis & Haber, 1992), compuesto por arreglos de secuencias pequeñas parcialmente conservadas denominadas STR-A, B, C y D (SubTelomeric Repeated) y un posible elemento central nombrado core X, de secuencia variable con una longitud aproximada de 559 pb (Louis & Haber, 1992; Louis et al., 1994). Cuando el telómero contiene ambos elementos, el elemento Y' se localiza más cerca al extremo cromosomal, y de igual forma a los arreglos en *tándem* del elemento Y', pequeños tramos de ADN telomérico pueden estar presentes entre cada uno de estos elementos (Figura 2). En condiciones de acortamiento del telómero, estos tramos internos de repetido son capaces de funcionar como sustrato para el alargamiento de los telómeros (Walmsley et al., 1984). Aunque a la fecha no existe una función particular para las TAS, se ha determinado que pueden actuar como secuencia barrera para limitar la expansión de la heterocromatina, y el silenciamiento de genes (Pryde & Louis, 1999; Tashiro et al., 2017), contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica, y desempeñan un papel importante en la adaptación y evolución, ya que estos elementos frecuentemente contienen secuencias no codificantes capaces de transcribirse, los cuales a través de diversos mecanismos regulan la actividad de los componentes involucrados en el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Azzalin & Lingner, 2015; Azzalin et al., 2007). Entre éstos elementos se incluyen: transposones (J. M. Kim et al., 1998), pseudogenes y diversos grupos de genes, la mayoría de ellos implicados en la respuesta a estrés, adaptación ambiental y variación antigénica (Barry et al., 2003; Fabre et al., 2005; Hansen et al., 2005). La prevalencia de este tipo de genes se encuentra relacionada con la dinámica de las regiones subteloméricas que están sujetas a mayores tasas de recombinación que el resto del genoma, conduciendo a eventos de duplicación de genes no restringidos a presión de purificación, que dan lugar a una rápida divergencia que contribuye a la adaptación a nuevos nichos (C. A. Brown et al., 2010; N. W. G. Chen et al., 2018).

En hongos otro grupo de genes frecuentemente localizado en estas regiones, corresponde a los genes relacionados con helicasas RecQ (Gao et al., 2002; Mandell et al., 2005; Sanchez-Alonso & Guzman, 1998), esta presencia de genes de helicasas ligados a telómeros entre grupos taxonómicos con al menos 400 millones de años de divergencia como ascomycetes y basidiomycetes, sugiere que podría tratarse de un mecanismo ancestral de protección de los telómeros bajo ciertas circunstancias (Gao et al., 2002). En efecto se ha demostrado en diversos organismos que la pérdida de la actividad de la telomerasa resulta en un acortamiento progresivo de los telómeros que eventualmente conduce a la senescencia replicativa, sin embargo, un pequeño porcentaje de la población celular es capaz de mantener la elongación de los telómeros mediante mecanismos basados en recombinación (Lundblad & Blackburn, 1993).

		Estructura telomérica				Vía de mantenimiento	Telotipo
Telomerasa +	Y'	ADN no telomérico	Elemento X 0.3-3.75 kb	Elemento Y' (0-4) 5.2 o 6.7 kb	Repetido telomérico	Telomerasa	TERT
	X					Telomerasa	TERT
Telomerasa - Pre-supervivientes	Y'					Ninguna	SEN
	X					Ninguna	SEN
Superviviente Tipo I	Y'					Rad51/Rad52	ALT I
Superviviente Tipo II	Y'					Rad50/Rad52/Sgs1	ALT II
	X					Rad50/Rad52/Sgs1	ALT II

Figura 2. Organización del extremo cromosomal en *S. cerevisiae*.

Las cepas silvestres telomerasa⁺ contienen tramos de repetidos teloméricos asociados a secuencias subtelo méricas Y' y/o X separados por tramos cortos de repetidos teloméricos. En ausencia de la telomerasa ocurre el acortamiento progresivo de los telómeros que eventualmente conduce a la senescencia replicativa. Células supervivientes telomerasa⁻ son capaces de mantener la longitud de los telómeros por vías alternativas de manera dependiente de Rad52. Supervivientes tipo I presentan amplificación de múltiples copias del elemento Y'. Supervivientes tipo II presentan largos tramos heterogéneos de repetidos teloméricos. Modificado de Makovets et al. (2008).

De acuerdo con su patrón de amplificación y requerimientos genéticos en *S. cerevisiae* se han descrito dos tipos de supervivientes (Figura 2). Tipo I que requieren de la actividad de *RAD51* y *RAD52* y muestran amplificaciones en *tándem* del elemento Y' y supervivientes tipo II que presentan tramos heterogéneos y extensos de repetidos teloméricos y requieren de la función de *RAD50*, *RAD52* y *SGS1* (Q. Chen et al., 2001; Huang et al., 2001; Teng & Zakian, 1999), este último gen codifica para una helicasa de la familia RecQ y aunque no se localiza sobre la región subtelomérica su actividad contribuye al retraso de la senescencia y promoción de la resolución de la recombinación (Lee et al., 2007). De manera similar, en supervivientes de *Schizosaccharomyces pombe* se ha observado un incremento en la expresión de este tipo de genes de la familia RecQ de localización subtelomérica, y su sobreexpresión en mutantes telomerasa negativas se encuentra relacionada con la aceleración en la formación de supervivientes (Mandell et al., 2005).

1.2. Telomerasa

En cada ciclo de división celular las secuencias teloméricas se acortan progresivamente a causa de la síntesis incompleta de la cadena rezagada durante la replicación del ADN, que se origina por la incapacidad de la ADN polimerasa de replicar completamente el extremo 3' del ADN, fenómeno conocido como problema de la replicación final (Olovnikov, 1972; Watson, 1972). El complejo enzimático ribonucleoprotéico llamado telomerasa se encarga de solucionar este problema al sintetizar de *novo* el ADN telomérico en la mayor parte de los organismos eucarióticos, sus componentes centrales son una subunidad proteica que desempeña la actividad catalítica de transcriptasa reversa conocida como TERT (TELomerase Reverse Transcriptase) y una subunidad de ARN llamada TER (Telomerase RNA) unida de manera no covalente a TERT, que contiene la secuencia complementaria al motivo del repetido telomérico y sirve como molde para su síntesis mediante retrotranscripción (Cohen et al., 2007; Greider & Blackburn, 1987). Cuando el telómero se ha acortado drásticamente, se desdobra para generar el llamado estado extendido y el extremo 3' monocatenario es empleado como iniciador para sintetizar la cadena rica en G de los telómeros para alargarlos, eventualmente mediante los mecanismos convencionales se sintetiza la cadena complementaria para generar una molécula de doble hebra (Blackburn, 1992).

En organismos unicelulares y células proliferativas de metazoarios ambos componentes de la telomerasa se expresan constitutivamente, mientras en levaduras el componente de ARN se expresa en muy bajas cantidades, con un estimado de 30 moléculas por célula, por lo que corresponde al factor que limita el ensamble y actividad de la telomerasa en este organismo (Mozdy & Cech, 2006). En eucariontes superiores la subunidad TERT es el componente que limita la actividad de la telomerasa y su expresión decrece conforme ocurre el proceso de diferenciación celular (Meyerson et al., 1997). A causa de la inactividad de la telomerasa y al acortamiento progresivo de los telómeros durante cada ciclo de división celular, las células somáticas poseen una capacidad finita de divisiones celulares conocido como límite de Hayflick, antes de alcanzar una longitud crítica de las secuencias teloméricas que conduce al arresto del ciclo celular (Hayflick & Moorhead, 1961). Por lo anterior el número de divisiones posibles de las células somáticas se encuentra definido por la longitud inicial de sus telómeros (Allsopp et al., 1992), en tanto la reactivación y sobreexpresión de TERT es suficiente para estabilizar la longitud de los telómeros y permitir su división ilimitada, sobrepasar la senescencia y extender su esperanza de vida (Bodnar et al., 1998; Masutomi et al., 2000).

Por otra parte, en *Drosophila melanogaster* se ha descrito otro mecanismo de alargamiento alternativo de los telómeros que se basa en el uso de los elementos retrotransponibles, HeT-A, TART y TAHRE que se localizan en los extremos cromosomales (Abad et al., 2004; J. M. Mason & Biessmann, 1995). En ausencia de la actividad de la telomerasa algunas células supervivientes y en menor proporción algunas líneas celulares inmortalizadas y líneas celulares derivadas de tumores son capaces de mantener la elongación de los telómeros mediante mecanismos de alargamiento alternativo conocidos como ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) dependientes de RAD52 en levaduras y del complejo MRE11/RAD50/NBS1 en mamíferos (Bryan et al., 1997; Lundblad & Blackburn, 1993; Zhong et al., 2007).

1.2.1. Subunidad TERT

En la actualidad todas las subunidades catalíticas descritas a la fecha a lo largo de diversos grupos taxonómicos se encuentran ampliamente conservadas y presentan cuatro dominios denominados: dominio TEN (Telomerase Essential N-terminal domain), dominio TRBD (TR-Binding Domain), dominio RT (Reverse Transcriptase) y dominio CTE (C-Terminal Extension) (Steczkiewicz et al., 2011) (Figura 3). Esta alta conservación de secuencias que lo hace fácilmente identificable por métodos convencionales de alineamiento y análisis de secuencias, en conjunto con el hecho de que en eucariontes superiores constituye el factor que limita el ensamble del complejo, han propiciado que la mayoría de los estudios acerca del ensamble y funcionamiento de la telomerasa se centren en esta subunidad. Mientras los dominios TRBD y RT son requeridos para la actividad de la enzima los dominios TEN y CTE son indispensables para la interacción y reclutamiento de la enzima al telómero, este último mediado por la proteína TPP1 a través de la interacción con el dominio TEN (Schmidt et al., 2014).

El dominio TEN y el dominio TRBD contienen los motivos conservados GQ y CP, QFP y T respectivamente, que en levadura corresponden a las regiones hipomutables I-IV, ambos dominios se encuentran conectados por una secuencia espaciadora no conservada de longitud variable que en conjunto conforman la extensión amino terminal (N-Terminal Extension, NTE) (Friedman & Cech, 1999; Xia et al., 2000). TEN asimismo contiene el sitio de anclaje que interactúa con la región 5' de la cadena sencilla del repetido telomérico, promoviendo su estabilización, además del posicionamiento en el sitio activo durante la adición de nucleótidos, a través de posibles cambios conformacionales (Jurczyk et al., 2011; Lue, 2005).

El dominio TRBD establece contacto con dominios de cadenas sencilla y doble de la subunidad de ARN que se forman por el plegamiento de dicha subunidad, como el tallo I y II de *Tetrahymena* y el dominio CR4/CR5 en humano (Moriarty et al., 2004; Rouda & Skordalakes, 2007). Mutaciones puntuales en los motivos CP y T resultan en una disminución de la afinidad por TER propiciando defectos en el ensamble y actividad de la telomerasa (Lai et al., 2002).

El dominio RT al igual que todas las familias de transcriptasas reversas conserva los siete motivos nombrados 1, 2, A, B', C, D, y E, pero a diferencia de éstos, la distancia entre los motivos A y B' es más larga por inserción de una secuencia conocida como IFD (Insertion in Fingers Domain) que se encuentra involucrada en la procesividad y el reposicionamiento del ADN respecto al molde y posiblemente tiene un papel en la translocación de unidades de repetido (Lue et al., 2003). El análisis de secuencias de los dominios RT de diversas retrotranscriptasas muestran que TERT filogenéticamente comparte un clado con los retroelementos PLEs (Penelope-Like Elements) no canónicos que carecen del dominio endonucleasa y exhiben ocurrencia de repetidos teloméricos en los extremos, sugiriendo que un retroelemento ancestral en común pudo haberse separado de la secuencia templete de ARN y evolucionado en la subunidad catalítica de la telomerasa (Arkhipova et al., 2003; Gladyshev & Arkhipova, 2007).

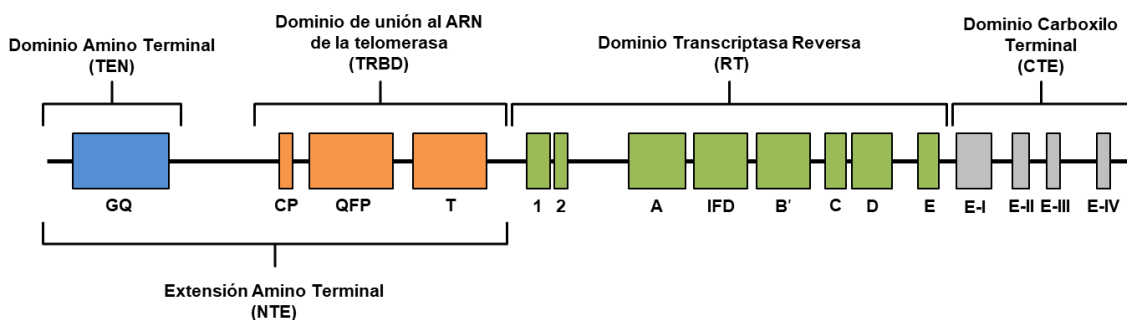


Figura 3. Dominios estructurales de la subunidad catalítica de la telomerasa de vertebrados.

La extensión de los dominios es indicada por corchetes. En la parte inferior se muestran los motivos conservados de cada dominio importantes para la función de la telomerasa representados por recuadros de colores. Una secuencia espaciadora de longitud variable localizada en la extensión amino terminal separa a los dominios TEN y TRBD.

Al igual que otras polimerasas, TERT presenta una estructura similar a una mano derecha donde el dominio RT conforma dos subdominios que corresponden a la palma y los dedos, en donde se localizan el sitio catalítico y sitio de unión de los nucleótidos entrantes respectivamente, mientras el dominio CTE conforma la estructura de pulgar (J. J. L. Chen & Podlevsky, 2016), este dominio carece de una secuencia primaria de aminoácidos conservada, y su papel en la actividad de la telomerasa va desde lo esencial hasta lo carente de importancia entre diferentes organismos llegando incluso a estar completamente ausente, presenta sitios de unión al heterodúplex de ADN y ARN, y posiblemente contribuye a su estabilización (Wyatt et al., 2010).

1.2.2. Subunidad TER

La subunidad TER es un lncRNA (ARN largo no codificante) que además de funcionar como molde para la transcripción reversa sirve como sitio de andamiaje para proteínas relacionadas con el ensamblaje de la holoenzima funcional; contiene sitios de unión para la subunidad catalítica, sitios de unión para proteínas necesarias para la biogénesis de la holoenzima y en algunos grupos taxonómicos sitios para la unión de proteínas específicas (Greider & Blackburn, 1989; Zappulla & Cech, 2004). En su secuencia TER alberga el motivo complementario al repetido telomérico y elementos estructurales que participan en la estabilidad del complejo ribonucleoprotéico (Blackburn, 2005). A diferencia de TERT que se encuentra altamente conservado, la subunidad TER tiene una amplia divergencia; las secuencias TER de diferentes organismos muestran poca similitud y variaciones en su longitud. Mientras en ciliados este elemento es transcrito por la ARN polimerasa III produciendo transcritos de 140–210 nt (Lingner et al., 1994; McCormick-Graham & Romero, 1995), en plantas y vertebrados es transcrito por la ARN polimerasa II presentando una longitud alrededor de los 270 nt y 450 nt respectivamente (J. L. Chen et al., 2000; Song et al., 2019). De igual forma que en vertebrados, la transcripción de TER en levaduras y hongos filamentosos es mediada por la ARN polimerasa II, sin embargo, presentan una longitud más extendida que va desde los 928 nt en *Kluyveromyces nonfermentans* hasta los 2,425 nt en *Mycosphaerella graminicola* (X. Qi et al., 2013; Seto et al., 2002). Se ha sugerido que esta variabilidad de tamaños podría ser resultado de la adquisición o pérdida de una variedad de dominios estructurales especie-específicos a partir de un ancestro en común, el cual no ha sido identificado, mientras que el reconocimiento específico con la subunidad TERT y con otras proteínas que participan en la biogénesis del complejo, indica que ambos componentes siguieron rutas co-evolutivas, que les permitieron preservar algunos dominios estructurales (Nelson & Shippen, 2015). A pesar de la amplia diferencia en longitud y secuencias nucleotídicas, TER posee una estructura secundaria conservada (Figura 4), que contiene elementos estructurales que son esenciales para la actividad enzimática, ya que estos participan en la estabilidad de la subunidad TER, en la interacción con TERT, y en el ensamble y localización del complejo (J. L. Chen et al., 2000; Egan & Collins, 2012).

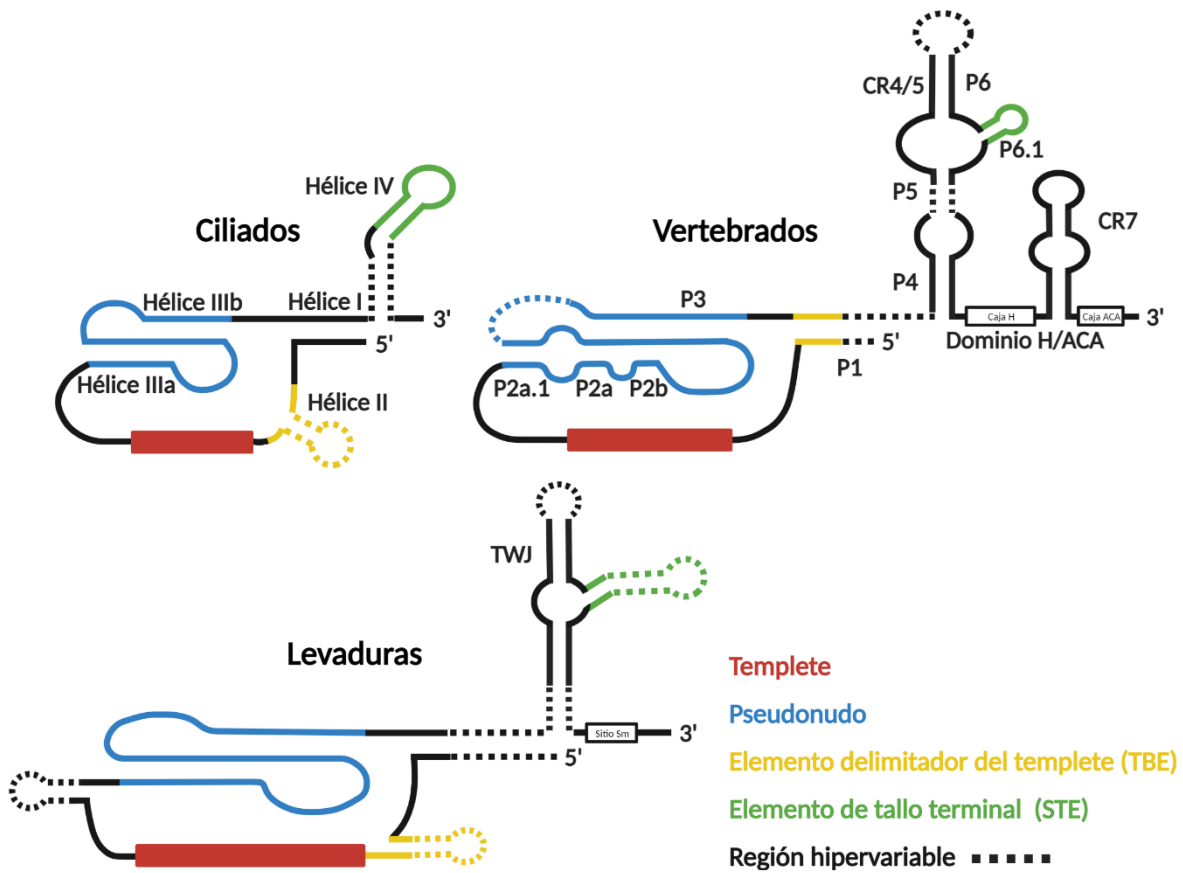


Figura 4. Estructura secundaria de la subunidad de ARN de la telomerasa de ciliados, vertebrados y levaduras.

En colores se muestran los elementos estructurales conservados. Regiones hipervariables entre especies son indicadas con líneas punteadas.

Dominio Template: el dominio template se localiza en una región de cadena sencilla en el extremo 5' del transcrito y contiene la secuencia nucleotídica complementaria a la cadena rica en G del ADN telomérico; tiene una longitud de al menos una y media copias del motivo del repetido telomérico. En este dominio, el extremo 3' se utiliza para el alineamiento con el extremo 3' monocatenario del ADN telomérico, mientras el extremo 5' se utiliza como molde para la transcripción reversa (Gilley & Blackburn, 1996). Mutaciones en este dominio producen cambios en la secuencia del repetido telomérico, así como también alteraciones en la procesividad de la enzima e incluso el deslizamiento de la secuencia template (Gilley & Blackburn, 1996; Singer & Gottschling, 1994; Webb & Zakian, 2008).

Elemento delimitador del templete (Template Boundary Element, TBE): adyacente al dominio templete se localiza el elemento 5' colindante al templete el cual además de funcionar como sitio de unión para la subunidad catalítica, proporciona una barrera física mediante la formación de una estructura de hélice, que define el límite del templete para que la telomerasa no sobrepase el dominio molde y se sintetice solo el repetido telomérico sin incluir los nucleótidos adyacentes (O'Connor et al., 2005; Prescott & Blackburn, 1997), de igual forma alteraciones en su secuencia provocan que la síntesis del ADN telomérico se produzca más allá del dominio templete, mientras la restauración de la hélice de este dominio mediante mutaciones compensatorias restablece el límite normal (Autexier & Greider, 1995; Box et al., 2008).

Dominio pseudonudo: río abajo del dominio templete se localiza el dominio pseudonudo, el cual participa en la unión con la subunidad catalítica y procesividad de la enzima (Qiao & Cech, 2008; Theimer et al., 2005) observándose que esta estructura en ciliados, vertebrados, levaduras y hongos filamentosos, contiene tramos ricos en U y A que conforman dos estructuras de tallo-asa parcialmente sobrelapadas, en levaduras y hongos filamentosos estas regiones son denominadas CS3 y CS4, respectivamente (Kuprys et al., 2013; Y. Tzfati et al., 2003). Durante el plegamiento se forma una estructura de tallo entre los residuos de U de CS3 y los residuos de A de CS4, mientras los residuos de U libres en el asa 1 de CS3 que quedan paralelos con las bases U-A, permiten la formación de una estructura de triple hélice a través del apareamiento de bases Hoogsteen de A•U (Ulyanov et al., 2007). Adicionalmente a las triples bases U-A•U que se encargan de proporcionar estabilidad a la estructura, se ha descrito que la triple hélice también puede ser estabilizada por enlaces de G-C•U y contener apareamientos wobble de G:U. Mientras las mutaciones puntuales que afectan la formación de la triple hélice abolen la función de la telomerasa, sustituciones de las triples bases de U-A•U por triples bases de C-G•U o C-G•C⁺ restauran la actividad enzimática (Shefer et al., 2007; Theimer et al., 2005).

Elemento de tallo terminal (Stem Terminus Element, STE): se localiza en el extremo 3' del transcrito, es un elemento esencial para el ensamble y activación del complejo RNP ya que este actúa como modulador alostérico permitiendo el adecuado plegamiento y funcionamiento de los dominios de la subunidad (Y. Brown et al., 2007; Webb & Zakian, 2015). En vertebrados este elemento contiene la estructura de tallo y asa P6.1 localizada en una región conformada por dos secuencias conservadas (Conserved Regions, CRs) que constituyen el dominio CR4/CR5 o dominio de activación, requerido para el correcto ensamble y la actividad de la enzima por medio de las interacciones ARN-Proteína y ARN-ARN (J. L. Chen et al., 2002; Ueda & Roberts, 2004). Mientras en ciliados la hélice IV funciona de manera análoga a P6.1 de vertebrados, por lo que en estos organismos también es requerido para la actividad catalítica (D. X. Mason et al., 2003). En levaduras este elemento corresponde a la unión de tres vías (Three-Way Junction, TWJ) la cual también resulta crítica para la actividad de la telomerasa *in vivo* e *in vitro* de acuerdo con las observaciones realizadas en *Kluyveromyces lactis* (Y. Brown et al., 2007).

1.2.2.1 TER: Transcripción y biogénesis

Como se mencionó previamente la transcripción y las vías de procesamiento de la subunidad TER también son divergentes entre organismos, en ciliados la transcripción de TER es mediada por la ARN Polimerasa III y finaliza después de copiar un tramo de A para dejar un fragmento corto de poly(U) en el extremo 3' del transcrito, en *Tetrahymena thermophila* este tramo funciona como sitio de unión para la proteína p65 que contiene un motivo La-RRM característico de proteínas de unión a ARN, además p65 interactúa con la hélice I y IV de TER, estas interacciones inducen cambios conformacionales que promueven la unión con TERT y son requeridas para la acumulación del complejo RNP *in vivo* al igual que la posterior asociación del complejo de proteínas p19, p45, p50, p75 y Teb1 (Yehuda Tzfati & Chen, 2012; Witkin & Collins, 2004). En levaduras y vertebrados TER es transcrito por la ARN Polimerasa II, en ambos organismos al transcrito nascente de TER se le adiciona la caperuza 5' de TMG (2,2,7-trimetil guanosina) y la cola de poly(A) en el extremo 3'.

En *S. cerevisiae* adicionalmente se ha detectado la presencia de una fracción no poliadenilada cuya terminación de la transcripción es mediada por la vía Nrd1-Nab3-Sen1, presenta una longitud más corta con cerca de 90 nt menos y representa el mayor porcentaje de abundancia en contraste al 5-10% de la fracción poliadenilada observada, aunque inicialmente se había propuesto que esta forma correspondía al precursor de la forma funcional no poliadenilada de TLC1 que se asocia al complejo RNP, a la fecha esa idea ha sido desechada y no se ha establecido un papel claro para su función (Chapon et al., 1997; Noel et al., 2012). La vía de terminación de la transcripción mediada por el complejo Nrd1-Nab3-Sen1 es propia del procesamiento de ARNs pequeños nucleares (snRNAs) y ARNs pequeños nucleolares (snoRNAs) y de igual forma a la biogénesis de snRNAs en levaduras y hongos filamentosos se ha observado que el procesamiento del transcrito primario de TER comparte otras similitudes, del mismo modo a esta clase de transcritos el transcrito primario de TER contiene cerca del extremo 3' un motivo rico en residuos de uridina denominado sitio Sm, requerido para la unión con el complejo hetero-heptamérico Sm que promueve la hipermetilación de la caperuza y acumulación del complejo RNP, cuando el complejo Sm7 se encuentra unido al sitio Sm, este delimita el procesamiento del extremo 3' que sufre el transcrito para adquirir su forma madura funcional, por lo que la carencia de un sitio Sm funcional en TER conduce al acortamiento de los telómeros en levaduras (Seto et al., 1999; Tang et al., 2012). Adicionalmente el procesamiento del extremo 3' puede requerir de una reacción incompleta de corte y empalme como se ha descrito en algunas levaduras y hongos filamentosos los cuales contienen un sitio de corte 5' y un sitio de ramificación localizados río abajo del sitio Sm, requeridos para la unión del espliceosoma y la liberación de la forma activa del transcrito sin producir la ligación de exones (Box et al., 2008; Kannan et al., 2015). Entre tanto, la subunidad TER de vertebrados comparte una vía de biogénesis y tráfico igual a la de snoRNAs, específicamente a un subgrupo de snoRNAs denominados ARNs pequeños de cuerpos de Cajal (scaRNAs), los cuales contienen un dominio estructural llamado caja H/ACA localizado en el extremo 3', que sirve como sitio de unión para proteínas accesorias que median el procesamiento adecuado y tráfico nuclear de TER (Cristofari et al., 2007; Fu & Collins, 2003).

La caja H/ACA, funciona como sitio de reconocimiento para la unión del el complejo disquerina (dyskerin, NHP2, NOP10 y GAR1), estructuralmente contiene dos horquillas cada una seguida de una región de cadena sencilla denominadas bisagra y cola que corresponden a las regiones conservadas CR6 y CR8 respectivamente, sobre las que se localizan los motivos conservados de caja H cuyo consenso es 5'-AnAnnA-3' y el motivo ACA (Egan & Collins, 2012; Kiss et al., 2010). La asociación del complejo disquerina en conjunto con la asistencia de otras proteínas como TCAB1 que presenta unión a la caja CAB localizada en el asa de CR7, es necesaria para la localización de TER en los cuerpos de Cajal en donde ocurre la asociación con TERT y colocalización hacia los telómeros (Egan & Collins, 2012; Yehuda Tzfati & Chen, 2012).

1.3. *Ustilago maydis*

U. maydis es un hongo basidiomiceto dimórfico, perteneciente al orden de los Ustilaginales y miembro de la familia Ustilaginaceae conformada por 17 géneros y 607 especies usualmente patógenas de plantas (Kirk et al., 2008). Este hongo es el agente causal del carbón del maíz o huitlacoche en su hospedero (*Zea mays* L.) y en teocintle (*Zea mays* spp. *parviglumis* y *Zea mays* spp. *mexicana*) que se caracteriza principalmente por la formación de tumores en los tejidos aéreos de la planta hospedera (León-Ramírez et al., 2014). *U. maydis* no es un parásito obligado, pero requiere de una planta hospedera para completar su ciclo de vida (Figura 5) y durante éste exhibe tres formas celulares: una forma unicelular haploide no patogénica, saprofítica que se reproduce por gemación, una forma filamentosa dicariótica patogénica que resulta del apareamiento entre de dos células haploides (esporidios) sexualmente compatibles, que mantiene una relación biotrófica con su hospedero y finalmente una forma diploide (teliosporas) que se produce dentro de las tumoraciones y constituye la forma de dispersión del hongo (Banuett, 1995).

1.3.1. Ciclo de vida de *U. maydis*

La regulación del ciclo de vida del hongo es controlada por un sistema de apareamiento tetrapolar formado por los *loci* de tipo de apareamiento *a* y *b*. El *locus* bialélico *a* (*a1* y *a2*) controla el reconocimiento y la fusión celular, el cual codifica para los componentes del sistema de apareamiento que consta de *mfa1* y *mfa2* que codifican para los precursores de feromonas lipopeptídicas, y de *pra1* y *pra2* que codifican para los receptores de dichas feromonas, los cuales contienen siete dominios transmembranales que permiten su acoplamiento con la proteína trimérica G (Banuett, 1995). El reconocimiento sucede cuando la feromona de un tipo de apareamiento (ej. Mfa1) es reconocida por el receptor del tipo de apareamiento opuesto (ej. Pra2), lo cual conduce a la disociación de la proteína G y a la activación de la vía de señalización de AMPc así como también de la vía de señalización MAPK que convergen en la activación de Prf1 (Pheromone Response Factor 1) un regulador maestro que controla el ciclo celular, el crecimiento filamentoso y desarrollo patogénico a través de la activación de otros factores de transcripción que incluyen los *locus* de apareamiento *a* y *b* (Muller et al., 2003; Regenfelder et al., 1997). El reconocimiento provoca el arresto del ciclo celular y desencadena la formación de tubos de conjugación, que se unen en el extremo apical para formar el micelio dicariótico infectivo (Snetselaar et al., 1996; Spellig et al., 1994). La formación del tubo conjugativo en conjunto con el desarrollo patogénico son controlados por un complejo heterodimérico conocido como bE/bW que es codificado por el *locus* multialélico *b*. El *locus b* está compuesto de dos genes que se transcriben de manera divergente denominados *bE* y *bW*, con más de 25 alelos (Kronstad & Leong, 1990). La dimerización ocurre únicamente cuando las esporidias que se aparean tienen tipos de apareamiento *b* diferentes (ej. $bE1bWn \neq 1$); una vez dimerizado actúa como factor de transcripción promoviendo la transcripción del regulador maestro Rbf1 que a su vez promueve la inducción de un conjunto de factores de transcripción que controlan grupos de genes reguladores del ciclo celular y de genes de efectores implicados en la supresión de la respuesta inmune y alteración del metabolismo de la planta (Gillissen et al., 1992; Heimel et al., 2010; Lanver et al., 2014).

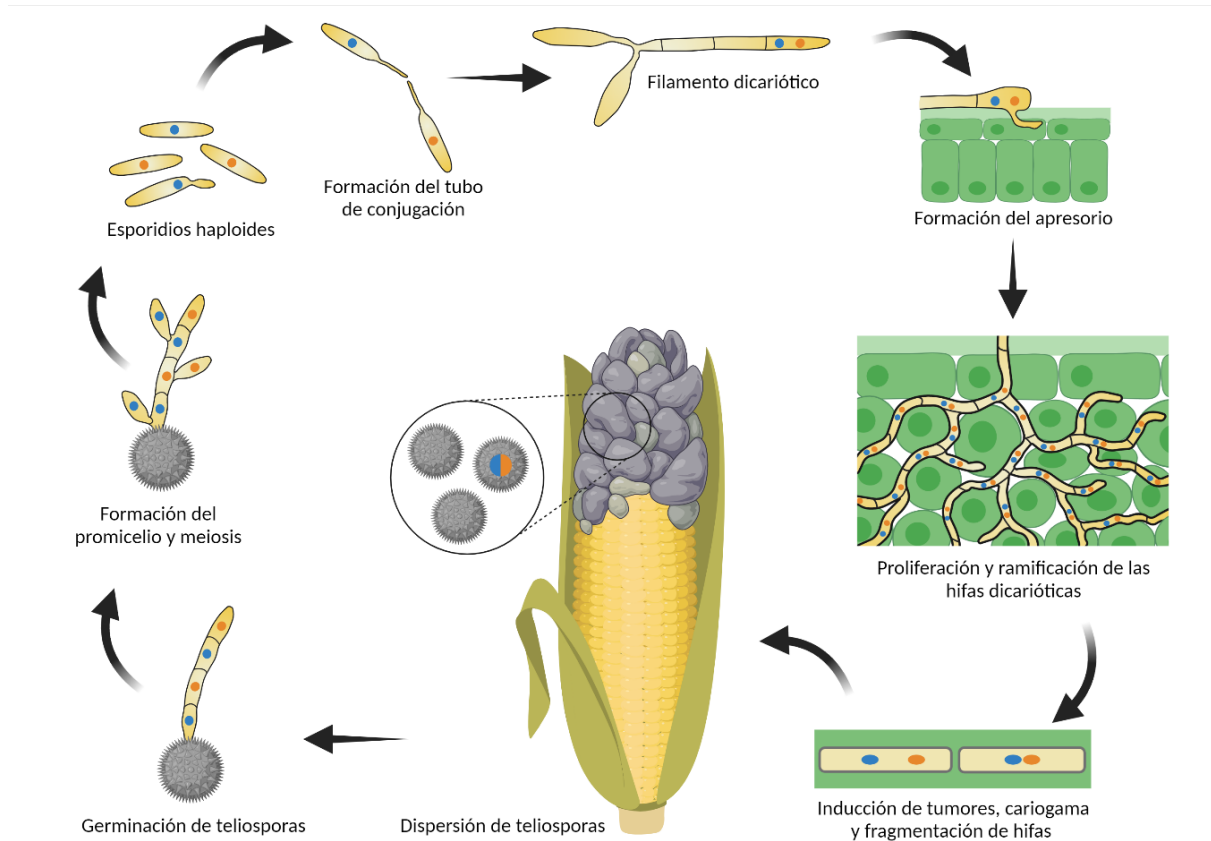


Figura 5. Ciclo de vida de *U. maydis*.

Sobre la superficie de la planta la transición dimórfica comienza con el reconocimiento entre células haploides sexualmente compatibles mediante un sistema feromona-receptor que resulta en la formación de los tubos de conjugación que se fusionan para producir un micelio dicariótico, seguido de la formación del apresorio, penetración y proliferación dentro de los tejidos de la planta para finalizar con la formación de esporas.

Sobre la superficie de la planta, el micelio dicariótico incipiente es capaz de desarrollar una estructura llamada apresorio que le permite penetrar al tejido vegetal, posteriormente ocurre el crecimiento intracelular de las hifas por invaginación de la membrana plasmática de la planta, estableciéndose una interacción biotrófica (Kahmann et al., 2000). Subsecuentemente se produce el crecimiento intercelular, la proliferación masiva del micelio e incremento en el número y tamaño de las células del huésped que resulta en la formación de tumores. A continuación, ocurre la cariogamia y la fragmentación de las hifas para dar lugar a la formación de teliosporas, que eventualmente son dispersadas en el medio ambiente, donde germinan produciendo el promicelio en el que ocurre la meiosis para formar cuatro nuevas esporidias capaces de reiniciar el ciclo de vida del hongo y de propagarse indefinidamente bajo condiciones de laboratorio (Kahmann et al., 2000).

1.3.2. *U. maydis* como organismo modelo

En la actualidad *U. maydis* constituye uno de los hongos patógenos más importantes para el estudio del dimorfismo fúngico, la patogénesis, la regulación del ciclo celular, la recombinación y reparación del ADN (Bolker, 2001; Dean et al., 2012; Holloman et al., 2008). La existencia de su fase haploide levaduriforme de fácil manejo y capacidad para completar su ciclo de vida en un periodo menor a tres semanas bajo condiciones de invernadero han permitido el desarrollo de una serie de herramientas moleculares que han simplificado y generado avances en los estudios sobre este hongo modelo (Banuett, 1995; Steinberg & Perez-Martin, 2008). Para este organismo se han desarrollado sistemas de transformación altamente eficientes ($>10^4 \mu\text{g}^{-1}$ ADN) con vectores que contienen secuencias de replicación autónoma (ARS) que permiten la edición, inserción o delección de genes por recombinación homóloga (Brachmann et al., 2004; Tsukuda et al., 1988). Diversos genes se han utilizado con éxito como reporteros, marcadores de selección, además se han identificado y utilizado promotores constitutivos o inducibles basados en la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno (Bottin et al., 1996; Brachmann et al., 2001; Gold et al., 1994; Keon et al., 1991).

La regulación de la transición dimórfica mediada por un *locus* de control único, permite la construcción de cepas haploides solopatógenicas que se pueden utilizar para identificar la regulación de genes implicados en la virulencia (Bolker et al., 1995). La disponibilidad de su genoma secuenciado, de un tamaño de 20.5 Mb distribuido en 23 cromosomas, con un contenido relativamente pequeño de 6,902 genes modelo (Kamper et al., 2006); ha permitido el estudio de comparación de genomas que ha incrementado el conocimiento de la contribución de genes y de procesos celulares ausentes en otros hongos modelos como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, incluyendo genes involucrados en la reparación del ADN, organización de microtúbulos, transporte a larga distancia, mitosis y algunas proteínas que encuentran relacionadas con el desarrollo de enfermedades en humanos (Kojic et al., 2002; Munsterkötter & Steinberg, 2007; Steinberg & Perez-Martin, 2008).

Mientras análisis comparativos con organismos filogenéticamente relacionados han revelado la presencia de un conjunto de efectores linaje-específico y abundante presencia de transcritos antisentidos naturales que en conjunto con la ausencia de la maquinaria de RNAi en *U. maydis* a diferencia de otras especies cercanas como *U. hordei* y *S. reilianum* que mantiene sus componentes, constituyen un sistema trazable para la identificación de determinantes de virulencia, coevolución con su hospedero, y relevancia y modulación de esta clase de transcritos (Donaldson et al., 2017; Okmen et al., 2018; Schirawski et al., 2010).

2. ANTECEDENTES

En la actualidad *U. maydis* también se ha posicionado como un modelo para el estudio del mantenimiento de los extremos cromosomales, en primera instancia se demostró que las secuencias teloméricas de *U. maydis* están conformadas por un promedio de 37–39 repeticiones de la secuencia TTAGGG que es idéntica a la encontrada en telómeros de vertebrados y en algunos hongos filamentosos (Guzman & Sanchez, 1994; Podlevsky et al., 2008) inmediatamente adyacente al repetido telomérico se identificó un elemento denominado *rumT* de 376 pb compuesto por dos regiones delimitadas por un sitio de reconocimiento *PstI* conservado que permite la determinación de la longitud del telómero mediante análisis del TRF, de manera colineal con este elemento hacia la dirección proximal al centrómero también se localizaron dos tipos de TAS, denominadas *UTASa* y *UTASb* (*Ustilago TAS*) estructuralmente análogas a los elementos Y' y X respectivamente, el primer elemento contiene una secuencia altamente conservada y se ubica frecuentemente adyacente a *rumT*, además de albergar en su extremo 5' un marco de lectura abierta que codifica para una helicasa denominada *USHER* (*Ustilago helicase recQ-like*) que presenta homología con otras helicasas ligadas a telómeros, preservando los siete dominios conservados del dominio central de helicasas RecQ. Por su parte *UTASb* corresponde a un elemento menos conservado, con fragmentos de marcos de lectura abierta de proteínas de función desconocida, este elemento se puede ubicar contiguo a *rumT* o posicionado previamente a *UTASa* (Sanchez-Alonso & Guzman, 1998; Sanchez-Alonso et al., 1996).

Por otra parte, mediante un análisis bioinformático se identificó un marco de lectura abierta de 4,116 pb localizado en el *locus um11198*, con los dominios característicos de la subunidad catalítica de la telomerasa, la interrupción de este gen denominado *trt1* (*telomerase reverse transcriptase 1*) produjo mutantes telomerasa negativas que mostraron un lento crecimiento, bajo potencial replicativo, el acortamiento gradual de los telómeros y defectos en la formación de teliosporas. Eventualmente también observaron la aparición de células supervivientes obtenidas después de 256 generaciones que mostraron alteraciones en el fragmento terminal de restricción, similar al que ocurre en cepas de *S. cerevisiae* telomerasa negativas (Bautista-Espana et al., 2014).

Adicionalmente se ha reportado que *U. maydis* contiene un conjunto de proteínas asociadas a telómeros que participan en su organización y homeostasis, las cuales presentan homología con las de otros eucariotas modelo, lo que sugieren que los mecanismos del mantenimiento del extremo cromosomal presentan propiedades similares (Sanchez-Alonso & Guzman, 2008; Yu et al., 2013). También se ha observado que ocurren ligeros cambios en la expresión de *trt1* durante el desarrollo biotrófico y una notable represión del *locus* donde posiblemente se origina la transcripción del gen putativo de TER (Lanver et al., 2018), lo que sugieren que ambos componentes podrían tener un papel importante durante la diferenciación celular independiente al alargamiento de los telómeros al igual que ocurre en otros organismos (Alcaraz-Perez et al., 2014; Imamura et al., 2008; Jose et al., 2018; Park et al., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La interrupción y caracterización de *ter1*, a la par del análisis diferencial de transcriptomas están enfocados en ampliar el conocimiento acerca de la contribución de los factores involucrados en el control del mantenimiento de los extremos cromosomales y obtener información sobre los mecanismos de regulación y posibles funciones independientes al alargamiento de los telómeros de estos componentes.

4. HIPÓTESIS

En el *locus ter1* reside el gen que codifica para la subunidad de ARN de la telomerasa de *Ustilago maydis*, su interrupción resulta en el fenotipo EST (Ever Shorter Telomeres) e induce cambios en la expresión transcripcional de genes involucrados en el mantenimiento del extremo cromosomal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el *locus ter1* en la cepa 518 de *U. maydis* y analizar los perfiles de expresión transcripcional de la cepa silvestre 518 y mutantes *ter1::hph* de *U. maydis*.

5.1.1. Objetivos particulares

- Realizar el ensamble de un casete de interrupción para *ter1* de la cepa 518 de *U. maydis*.
- Obtener mutantes *ter1*⁻ mediante la interrupción del *locus* por recombinación homóloga de la cepa 518 de *U. maydis*.
- Realizar el análisis fenotípico de las mutantes *ter1::hph*.
- Realizar el ensamble de los transcriptomas y el análisis de expresión diferencial de la cepa 518 y mutantes *ter1::hph* de *U. maydis*.
- Identificar y clasificar genes cuyos productos proteicos diferencialmente expresados estén involucrados en el mantenimiento del extremo cromosomal de *U. maydis*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de las mutantes y caracterización fenotípica

6.1.1. Cepas y medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* y *U. maydis* utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. El cultivo de *E. coli* se realizó a 37°C durante 18 horas en medio LB (peptona de caseína 10 g/l, NaCl 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) cuando fue necesario. Las cepas de *U. maydis* se crecieron a 28°C durante 24 horas en medio YEPS (sacarosa 20 g/l, peptona de caseína 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l), adicionado con higromicina (200 µg/ml) cuando fue necesario.

Tabla 1. Cepas de microorganismos utilizados en este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>U. maydis</i> 521	<i>a1b1</i>	W.K. Holloman
<i>U. maydis</i> 518	<i>a2b2</i>	W.K. Holloman
<i>U. maydis</i> ter1-02	<i>a2b2, ter1::hph</i>	Este trabajo, derivada de 518
<i>U. maydis</i> ter1-24	<i>a2b2, ter1::hph</i>	Este trabajo, derivada de 518
<i>U. maydis</i> ter1-35	<i>a2b2, ter1::hph</i>	Este trabajo, derivada de 518
<i>U. maydis</i> ter1-40	<i>a2b2, ter1::hph</i>	Este trabajo, derivada de 518

6.1.2. Plásmidos

Para la construcción del casete de interrupción para *ter1* y ensayos posteriores se utilizaron los plásmidos mostrados en la Tabla 2, empleando a *E. coli* DH5α como cepa receptora.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Descripción	Tamaño	Referencia
pBluescript II KS (-)	<i>Amp^r, lacZα</i>	2,958 pb	Stratagene
pTer-5'	Plásmido derivado de pBluescript II KS (-) que contiene la secuencia flanqueante 5' de <i>ter1</i> , <i>Amp^r</i>	4,139 pb	Este trabajo
pTer-3'	Plásmido derivado de pBluescript II KS (-) que contiene la secuencia flanqueante 3' de <i>ter1</i> , <i>Amp^r</i>	4,133 pb	Este trabajo
pTer-Sub5'	Plásmido derivado de pBluescript II KS (-) que contiene las secuencias flanqueantes 5' y 3' de <i>ter1</i> , <i>Amp^r</i>	5,255 pb	Este trabajo
pTer1	Plásmido derivado de pBluescript II KS (-) que contiene la secuencia de interrupción para <i>ter1</i> , <i>Amp^r</i> , <i>Hyg^r</i>	7,294 pb	Este trabajo

pCM1007	Plásmido derivado de pBluescript KS (-) que contiene la secuencia de interrupción para <i>trt1</i> , Amp ^r , Hyg ^r	6,670 pb	W.K. Holloman
pCM54	Plásmido de replicación autónoma que confiere resistencia a higromicina, derivado de pUC12, Amp ^r , Hyg ^r	6,400 pb	Tsukuda & Holloman, 1989
pUT2	Plásmido derivado de pBluescript KS (-) que contiene 37-mer de repetido telomérico TTAGGG más 369 pb de UTAS, Amp ^r	2,521 pb	Guzmán & Sánchez, 1994

6.1.3. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 3 y fueron diseñados utilizando el programa PrimerSelect (DNASTAR, Inc.), a partir de la secuencia del genoma de *U. maydis* disponible en Genbank, los sitios de restricción diseñados para la construcción de la secuencia de interrupción se encuentran subrayados.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia 5'–3'	Descripción	Amplicón	Temperatura de alineamiento	Referencia
Cr8S1-5-Upp	AAGCGGCCGCTAGAGG GGTGGTTTGGGTTTGGT	Par utilizado para amplificar el extremo 5' de <i>ter1</i>	1,181 pb	64°C	Este trabajo
Cr8S1-5-Low	TCGGATCCGCTGGGTCT CGATGCTTTTCTGTA				Este trabajo
Cr8S1-3-Upp	CAGGATCCCTACATCGC GATAGCAGTTTG	Par utilizado para amplificar el extremo 3' de <i>ter1</i>	1,175 pb	64°C	Este trabajo
Cr8S1-3-Low	AAGCGGCCGCGGGTGTG GTCTATTGAACG				Este trabajo
WT- <i>ter1</i> -Upp	TCCGCCTTCCCTTCTTTG ATTTTG	Par utilizado para comprobar la integridad y/o la inserción de la secuencia de interrupción de <i>ter1</i>	2,362 pb 3,758 pb	60°C	Este trabajo
WT- <i>ter1</i> -Low	GTGGCCGACATGCGCTT TGAAC				Este trabajo
5H-Upp	GAAGGCGTGTGGCTCGG TTTGTTG	Par utilizado para comprobar la inserción del marcador de selección	1,757 pb	63°C	Este trabajo
5H-Low	TAGGAAGGCGGCGGAA TCAGTTGG				Este trabajo
3H-Upp	GGAAACCGACGCCCCAG CACT	Par utilizado para comprobar la inserción del marcador de selección	3,004 pb	63.9°C	Este trabajo
3H-Low	CTCAGCCGCGCCTTTA TCAGC				Este trabajo
Templete-Upp	ACCGCGCCTTACTGTCT GAA	Par utilizado para comprobar la delección del dominio templete	244 pb	55°C	Este trabajo
Templete-Low	TCCCACGTTCCAATTGCT TC				Este trabajo

6.1.4. Diseño de la secuencia de interrupción para *ter1*

El ensamble de la secuencia de interrupción para *ter1* se realizó de acuerdo con el diagrama mostrado en la figura A1. Se amplificaron los fragmentos flanqueantes 5' y 3' de *ter1* de aproximadamente 1,000 pb. El extremo 5' fue bordeado por sitios de corte *NotI* y *BamHI*, y el extremo 3' por sitios de corte *BamHI* y *NotI*. Cada fragmento fue insertado en el sitio *EcoRV* del vector pBluescript II KS (-), para generar los plásmidos pTer-5' y pTer-3', respectivamente. Del plásmido pTer-5' se escindió el fragmento *NotI/BamHI* y fue subclonado en el sitio *NotI/BamHI* de pTer-3'. El plásmido resultante fue pTerSub5' que contenía unidos ambos extremos de manera colineal, separados por un sitio *BamHI* en el cual se insertó el fragmento *BamHI* derivado de pCM1007, que contenía el gen quimérico *hph*. Obteniendo el plásmido pTer1 con la secuencia de interrupción para *ter1*, la cual fue escindida por digestión completa con *NotI*.

6.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un Termociclador T100 (Bio-Rad), utilizando reacciones con un volumen final de 50 μ l, con una composición como la que se muestra a continuación: buffer para PCR 10X 5 μ l, $MgCl_2$ 50 mM 1.5 μ l, mix dNTP's 10 mM 1 μ l, oligonucleótido delantero 0.4 μ l (100 mM), oligonucleótido reverso 0.4 μ l (100 mM), Platinum *Taq* DNA Polymerase Invitrogen 0.4 μ l (5 U/ μ l), ADN genómico 100 ng. Las condiciones de amplificación para los extremos flanqueantes de *ter1* fueron las siguientes: desnaturalización inicial un ciclo a 94°C durante 2 minutos; desnaturalización (94°C durante 30 segundos), alineamiento (64°C durante 30 segundos) y extensión (72°C durante 1 minuto) 30 ciclos; extensión final un ciclo a 72°C durante 5 minutos. Para el resto de los pares de oligonucleótidos se utilizó las temperaturas de alineamiento indicadas en la Tabla 3.

6.1.6. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos de ADN

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

6.1.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las reacciones de restricción con *EcoRV*, *NotI*, *BamHI*, *XhoI*, *XbaI*, *SalI*, *ScaI* y *PstI*, se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen), en resumen, en un tubo Eppendorf se agregaron 3 µl del buffer de reacción 10X, ADN problema 3 µl (1–2 µg/µl), enzima 1 µl (10 U/µl), agua destilada estéril cbp 30 µl. Las reacciones se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

6.1.8. Ligación de los fragmentos de restricción en el vector de clonación

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

6.1.9. Preparación de células competentes de *E. coli* DH5α

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5α se realizó de acuerdo con el método descrito por Berger & Kimmel (1987). A partir de un cultivo de *E. coli* en placa se preparó un precultivo, tomando una colonia e inoculando 5 ml de medio LB que se incubó a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se inocularon 250 ml de medio LB con 2.5 ml del precultivo y se dejó en incubación a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.5$ (Aproximadamente 3 horas). El paquete celular fue recolectado por medio de centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 12.5 ml de solución reguladora I (RbCl 100 mM, MnCl₂ 45 mM, CH₃CO₂K 88 mM, CaCl₂ 10 mM, LiCl 0.5 mM, glicerol 15%, pH = 5.8), se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregó 2 ml de solución reguladora II (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM, glicerol 15%, pH = 7.0), se agitó suavemente hasta disolver el paquete celular y se colocaron alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.1.10. Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5α se realizó de acuerdo con el método descrito por Berger & Kimmel (1987). En 200 µl de células competentes se agregaron 5 µl del producto de ligación, se mezcló suavemente y se colocó sobre hielo durante 30 minutos, inmediatamente después se colocó a 37°C durante 10 minutos, a continuación, se agregó 1 ml de medio LB para dejarlo en incubación a 37°C durante 1 hora.

Finalmente se sembró por extensión 100 µl de la suspensión de células en placas de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml).

6.1.11. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó de acuerdo con el método descrito por Sambrook et al. (1989). A partir de un cultivo de 5 ml incubado durante 18 horas a 37°C se recolectó el paquete celular por centrifugación a 11,000 rpm por 10 minutos, se removió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µl de Solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0), posteriormente se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se agregó 150 µl de la Solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial 11.5 ml, H₂O 28.5 ml), nuevamente se mezcló por inversión y se centrifugó a 11,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (fenol saturado en T.E. pH 8.2, en relación 25:24:1), se agitó fuertemente hasta homogenizar la emulsión para después centrifugarla a 11,000 rpm durante 5 minutos, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 11,000 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, nuevamente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y, por último, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente para resuspenderlo en 50 µl de agua destilada estéril.

6.1.12. Extracción de ADN Total de *U. maydis*

Para la obtención de ADN genómico de *U. maydis* se utilizó una modificación del método descrito por Sherman et al. (1986). A partir de cultivos incubados durante 18 horas de los cuales se recolectó el paquete celular mediante centrifugación a 3,500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se congeló colocándolo en refrigeración a -70°C durante 20 minutos. A continuación, el paquete celular se trituró con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, el producto pulverizado se transfirió a tubos de polipropileno y se resuspendió en 2 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%).

Posteriormente se agregaron 2 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó hasta homogenizar completamente y se centrifugó durante 15 minutos a 3,500 rpm. La fase superior se recuperó y se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó durante 10 minutos a 3,500 rpm. Después el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, nuevamente se centrifugó y se retiró el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril.

6.1.13. Purificación y cuantificación de ADN

Para la purificación y cuantificación de ADN se empleó el método descrito por Sambrook et al. (1989). A cada muestra de ADN se le agregaron 5 µl de RNase A (Thermo Scientific), se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 1 hora, a continuación, se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó hasta homogenizar completamente y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la fase superior y se le agregó un volumen de cloroformo, se mezcló fuertemente y se centrifugó a 11,000 rpm por 10 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 0.5 volúmenes de acetato de amonio (7.5 M, pH 5.5) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 11,000 rpm, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. La cuantificación de ADN se realizó por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific), la absorbancia se registró a una longitud de onda de 260 nm de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la concentración se determinó con la siguiente ecuación:

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

6.1.14. Transformación de *U. maydis*

La transformación de *U. maydis* se realizó de acuerdo con el método descrito por Sambrook et al. (1989). A partir de un cultivo con una DO₆₀₀ de 1.0–1.2 (alrededor de 18 horas de incubación) equivalente a una suspensión de aproximadamente 2.5×10^7 células/ml, se recolectó el paquete celular mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos, se resuspendió suavemente en 5 ml de SCS (sorbitol 1 M, citrato de sodio 50 mM, pH 5.8). Se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos, nuevamente el precipitado se resuspendió en 5 ml de SCS y se centrifugó. A continuación, el paquete celular se resuspendió en 500 µl de SCS, y se adicionaron 500 µl de solución de Lyzing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (L1412, Sigma-Aldrich) preparada al momento disuelta en SCS (50 mg/ml). Se homogenizó suavemente y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Una vez formados los protoplastos se centrifugaron a 1,800 rpm por 5 minutos y el precipitado se lavó dos veces con 3 ml de SCS en cada ocasión. Posteriormente se agregó 3 ml de STC (sorbitol 1M, CaCl₂ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5), los protoplastos se resuspendieron mezclando suavemente, se centrifugó a 1,800 rpm durante 5 minutos y a continuación el precipitado se resuspendió en 1 ml de STC. Después de esto se distribuyeron alícuotas de 50 µl en tubos de polipropileno a los cuales se les adicionaron previamente 2 µl de heparina (15 mg/ml) y 500 ng de ADN linealizado (en un volumen de 1–2 µl). La suspensión se dejó en hielo durante 10 minutos y se agregó lentamente 500 µl de PEG (sorbitol 1 M, Tris-HCl pH 10, CaCl₂ 100 mM, PEG 40%) se mezcló suave y nuevamente se dejó sobre hielo por 10 minutos. Se añadieron 6 ml de medio TOP (medio completo (Holliday, 1974), sorbitol 1 M, agar 0.8%), se mezcló suavemente por inversión y se vertió sobre placas de regeneración (capa inferior 12.5 ml de medio completo adicionado con higromicina 200 µg/ml, capa superior 12.5 ml de medio completo), para colocarlas en incubación a 28°C durante 5 días.

6.1.15. Análisis de la morfología colonial y celular de *U. maydis*

Para determinar si la delección de *ter1* producía algún efecto sobre la morfología colonial o celular, se realizaron análisis comparativos de las cepas silvestres y de las mutantes, para lo cual se realizó una observación directa de cultivos crecidos en placas de medio YEPS, y una observación al microscopio utilizando el objetivo 40X a partir de cultivos en fase exponencial.

6.1.16. Cinética de crecimiento de *U. maydis*

A partir de un cultivo en placa, se tomó una colonia y se inocularon 5 ml de medio YEPS, se colocó en incubación a 28°C hasta alcanzar una $DO_{600} = 1$, de este precultivo se tomaron 100 μ l y se inocularon en 100 ml de medio YEPS contenidos en un matraz de 250 ml. Los cultivos se dejaron en incubación a 28°C con agitación continua a 200 rpm durante 18 horas y se tomó una muestra de 2 ml cada dos horas, para medir la DO_{600} y realizar el conteo de UFC mediante diluciones seriadas.

6.1.17. Análisis del fragmento terminal de restricción en *U. maydis*

Para el análisis del fragmento terminal de restricción en *U. maydis*, se realizó una modificación del método descrito por Sanchez-Alonso et al. (1996). 5 μ g de las muestras de ADN total de *U. maydis* se digirieron con *Pst*I (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, los fragmentos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, como se describe previamente, una vez visualizados los productos, se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N, Invitrogen) para lo cual el gel se dejó sumergido en dos volúmenes de solución de depurinización (HCl 0.25 N) durante 20 minutos con agitación constante. A continuación, el gel se enjuagó con agua destilada estéril y se colocó en dos volúmenes de solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) con agitación continua durante 30 minutos. Nuevamente se realizó un enjuague con agua destilada estéril y, por último, se colocó en solución de neutralización (Tris-HCl 1M pH 7.4, NaCl 1.5 M) durante 30 minutos con agitación. Para la transferencia por capilaridad el gel se colocó sobre un puente de papel filtro (Whatman 3MM) previamente humedecido en buffer de transferencia SSPE 10X (NaCl 1.5 M, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.1 M, EDTA 0.01 M, pH 7.4) y dispuesto sobre una bandeja, después de esto, una membrana del mismo tamaño del gel se remojó en buffer de transferencia SSPE 10X y se colocó encima del gel seguido de tres hojas de papel filtro igualmente remojadas, asegurándose de que no se formaran burbujas de aire, finalmente se colocó una pila de papel absorbente para dejar llevar a cabo la transferencia durante 12 horas. El ADN se fijó a la membrana mediante exposición a luz UV a 254 nm durante 2 minutos.

La hibridación y detección se realizó utilizando la sonda marcada con digoxigenina-11-uridina-5'-trifosfato (Sigma-Aldrich) y solución de hibridación (Na_2HPO_4 0.5 M pH 7.2, SDS 7%, EDTA 1 mM y 1% BSA, Sigma Chemical CO. St Louis, MO. USA) de acuerdo con el método descrito en DIG DNA labeling and detection non-radioactive, Applications manual (Boehringer, 1989).

6.1.18. Ensayos de infección en plantas de maíz con *U. maydis*

Los ensayos de infección en plantas de maíz se realizaron de acuerdo con el método descrito por Puhalla (1968). De cultivos frescos en placa se tomó una colonia y se inocularon 5 ml de medio YEPS, se colocó en incubación a 28°C durante 12 horas en agitación constante, a continuación, se tomaron 100 μl del precultivo y se inoculó en 50 ml de medio YEPS se dejó crecer por 18 horas a 28°C y se midió la DO_{600} , los cultivos se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos y el paquete celular se resuspendió en agua destilada estéril para obtener una $\text{DO}_{600} = 10$. Con estas suspensiones se prepararon mezclas de las cepas compatibles (1:1 cruza silvestres y 1:3 cruza heterocigotas $terI^+/terI^-$). La inoculación se realizó en plántulas de maíz (MCS-02) a los 5 días post-emersión, inyectando 100 μl de la suspensión correspondiente. Se realizaron tres ensayos, utilizando en cada ensayo dos macetas, con ocho plántulas cada una para cada cruce, como control negativo se colocó una maceta con plántulas sin inocular. Las plantas fueron conservadas durante 21 días en condiciones de invernadero y se registraron las observaciones cada dos días.

6.2. Análisis Bioinformáticos.

6.2.1. Búsqueda de secuencias candidatas del gen *terI*

Para la identificación de *loci* donde pudiera localizarse el gen de TER en *U. maydis*, se empleó una modificación del método descrito por Chakrabarti et al. (2007). Se utilizó el software SnapGene® v.3.2.1 (de Insightful Science; disponible en snapgene.com) para realizar la búsqueda dentro del genoma de *U. maydis* de todas las regiones que contuvieran al menos una y media copias de la secuencia templete 5'-CCCTAA-3' considerando cualquier permutación posible, las secuencias identificadas en conjunto con 300 pb de cada extremo flanqueante fueron recuperadas.

Estas secuencias fueron empleadas como consulta para la realizar una búsqueda en BLAST (Altschul et al., 1990) de secuencias homólogas, dentro de los genomas de todas las especies de Ustilaginales disponibles a la fecha (Abril 30, 2019). Las secuencias de los *hits* fueron extraídas y almacenadas, secuencias correspondientes a repetidos teloméricos, marcos de lectura abierta, ARNs estructurales y secuencias no conservadas fueron descartadas. A continuación, las regiones con secuencias ortólogas localizadas en todas las especies, fueron inspeccionadas manualmente para identificar posibles eventos de variación en el dominio templete, las secuencias con inserciones o deleciones en el dominio templete putativo que impidieran la formación de una secuencia templete con una longitud de al menos 9 nt también fueron descartas.

6.2.2. Análisis *In silico* de loci análogos *ter1* en Ustilaginales

Los *loci* donde se localizaron embebidas las secuencias ortólogas que conservaron un posible dominio templete en todas las especies, fueron reexaminados para realizar un análisis de sintenia, aproximadamente 15 kb de secuencias de ambos extremos de los *loci* candidatos fueron extraídas. Nuevamente se emplearon los programas SnapGene® y BLAST con el fin de identificar ORFs ortólogos y delimitar las regiones intergénicas, utilizando la anotación del genoma de *U. maydis* como referencia. Con los mapas de la anotación física de cada región elaborados en SnapGene®, se generaron archivos .gbk que fueron empleados como entrada para el programa Easyfig Version 2.2.5 (Sullivan et al., 2011) para generar el mapa de sintenia final. A continuación, las regiones intergénicas donde se localizó el gen putativo de TER fueron extraídas; finalmente para identificar motivos conservados se realizó un alineamiento múltiple de secuencias empleado la versión online del software MAFFT (Kato et al., 2002).

6.2.3. Extracción de ARN y preparación de librerías de RNA-Seq

La extracción de ARN total de cada muestra se realizó por triplicado, como se describe a continuación: Colonias frescas de cada cepa fueron inoculadas en 5 ml de medio YEPS e incubadas a 28°C durante 18 horas, se tomaron alícuotas de 50 µl de estos precultivos y se inocularon en 5 ml de medio YEPS durante 10 horas.

Posteriormente matraces con 200 ml de medio YEPS fueron inoculados con alícuotas de 0.5 ml de la cepa correspondiente, hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.6-0.8$. El paquete celular fue recuperado mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y el paquete celular fue pulverizado con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, el producto pulverizado fue recolectado y se adicionó 2 ml de buffer de lisis R (acetato de sodio 0.02 M, SDS 0.5%, EDTA 1 mM, pH = 5.5), se agitó hasta homogenizar completamente. Alícuotas de 500 μ l de cada muestra fueron colocadas en tubos Eppendorf, se adicionó 500 μ l de fenol-acido (fenol equilibrado con acetato de sodio 0.02 M pH = 5.5), se homogenizó suavemente y se colocó en incubación a 65°C durante 5 minutos, mezclando ocasionalmente. Las muestras se dejaron enfriar, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue recuperado y se adicionó 500 μ l fenol-cloroformo-álcool isoamílico, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se realizaron dos lavados agregando 500 μ l de cloroformo y centrifugando a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C en cada ocasión, se adicionó 0.5 volúmenes de acetato de amonio (7.5 M, pH 5.5) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se colocó a -70°C durante 60 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol frío al 70%. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se resuspendieron en 100 μ l de agua destilada estéril y se trataron con DNase I, RNase-free (Merck KGaA, Darmstadt. Germany) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para la elaboración y secuenciación de librerías de ADNc se emplearon los servicios del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). Las librerías de ADNc fueron preparadas usando el kit TruSeq RNA Sample Preparation v2 LT (Illumina Inc.), la secuenciación se realizó en la plataforma Miseq de Illumina generando lecturas de tipo *paired-end* (extremos pareados) de 150 pb.

6.2.4. Filtrado y análisis de calidad de las lecturas de RNA-Seq

Para evaluar la calidad de las lecturas crudas de RNA-Seq se empleó el software FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010), posteriormente con el programa Trimmomatic v0.36 se realizó la eliminación de los adaptadores, lecturas de longitud menor a 25 nt y con un valor de calidad menor a 30 Phread, obteniendo una longitud promedio de lecturas de 148 nt, con los siguientes parámetros:

```
$ java -jar $TRIMMOMATIC_DIR/trimmomatic-0.36.jar PE -threads 10 -phred33
input_sample1_R1.fastq      input_sample1_R2.fastq      output_sample1_R1.fastq
output_sample1_R1_unpaired.fastq      output_sample1_R2.fastq
output_sample1_R2_unpaired.fastq
ILLUMINACLIP:$TRIMMOMATIC_DIR/adapters/TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:1:true
SLIDINGWINDOW:4:15 LEADING:3 TRAILING:3 AVGQUAL:30 MINLEN:25.
```

Después del filtrado de las lecturas nuevamente se reevaluó la calidad de las lecturas obtenidas con el programa FastQC.

6.2.5. Cuantificación de los transcritos y análisis de expresión diferencial de la cepa silvestre 518 y mutantes *ter1::hph* de *U. maydis*

Desde el módulo align_and_estimate_abundance.pl de la suite de Trinity v2.11.0 (Grabherr et al., 2011), las lecturas fueron alineadas a las secuencias codificantes (CDS) del genoma de referencia de la cepa 521 descargado de la base de datos del Ensembl (http://ftp.ensemblgenomes.org/pub/fungi/release-51/fasta/ustilago_maydis/cds/Ustilago_maydis.Umaydis521_2.0.cds.all.fa.gz) usando Bowtie2 v2.4.2 (Langmead & Salzberg, 2012), y la cuantificación de la abundancia de transcritos se llevó a cabo con el programa RSEM v1.3.3 (Li & Dewey, 2011), todo como se describe a continuación: `$TRINITY_DIR/util/align_and_estimate_abundance.pl --transcripts Ustilago_maydis.Umaydis521_2.0.cds.all.fasta --seqType fq --samples_file samples.txt --est_method RSEM --aln_method bowtie2 --gene_trans_map CDSs_gene_trans_map --prep_reference --output_dir RSEM_output --thread_count 10.`

Con los archivos de salida *.isoforms.results se generó el archivo de rutas file.listing_target_files.txt con la línea de comando:

```
$RSEM_output_dir find * -name '*.isoforms.results' > file.listing_target_files.txt.
```

A continuación, se realizó la construcción de las matrices de abundancia de genes e isoformas haciendo uso de la suite de Trinity con el siguiente comando:

```
$TRINITY_DIR/util/abundance_estimates_to_matrix.pl --est_method RSEM --  
gene_trans_map CDSs_gene_trans_map --name_sample_by_basedir --quant_files  
file.listing_target_files.txt --out_prefix RSEM_output.
```

Para el análisis de expresión diferencial las matrices de conteos generadas en el paso anterior fueron subidas a la plataforma online IDEAMEX que permite utilizar diferentes paquetes estadísticos para análisis de expresión diferencial, integrar los resultados y generar los gráficos correspondientes (Jimenez-Jacinto et al., 2019), los métodos seleccionados fueron: DESeq2 (Love et al., 2014), NOISeq (Tarazona et al., 2011), Limma-Voom (Ritchie et al., 2015), y EdgeR (Robinson et al., 2010), los valores de corte empleados para considerar los genes como expresados diferencialmente de manera significativa fueron: $\log_2FC \geq 2$ y $FDR \leq 0.01$.

6.2.6. Anotación y clasificación de los transcritos expresados diferencialmente en la cepa silvestre 518 y mutantes *ter1::hph* de *U. maydis*

Para la anotación de los péptidos predichos dentro del genoma de *U. maydis* (http://ftp.ensemblgenomes.org/pub/fungi/release-51/fasta/ustilago_maydis/pep/Ustilago_maydis.Umaydis521_2.0.pep.all.fa.gz) se hizo uso de la función automática del programa Trinotate v3.2.2 pipeline (Bryant et al., 2017). Las secuencias fueron analizadas usando blastx y blastp contra las bases de datos: UniProt, GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y EggNog, con un valor de corte E-value de 10^{-5} , a continuación desde la suite de Trinotate se hizo uso del software hmmer v3.3.1 (Finn et al., 2011) para la búsqueda de dominios contra la base de datos Pfam-A, además de los programas SignalIP v4.1 (Petersen et al., 2011) y TMHMM v2.0c (Krogh et al., 2001) para la búsqueda de sitios de corte de péptido señal y predicción de hélices transmembranales.

A continuación, con los identificadores de ontología génica (GO) y haciendo uso de la suite OmicsBox v1.4.12 (Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics, March 3, 2019, <https://www.biobam.com/omicsbox>) se hizo un filtrado por taxonomía (fungi) de los DEGs, se clasificaron y graficaron las asignaciones de los genes implicados, de acuerdo con la función molecular, proceso biológico y componente celular. Para la construcción de los gráficos y análisis de los datos de DEGs se utilizó el paquete Rstudio v1.4.1103 (RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>).

7. RESULTADOS

7.1. Identificación de *loci* candidatos *ter1*

La búsqueda en el genoma de *U. maydis* de regiones potenciales que puedan albergar al menos una y medio copias del dominio templete (CCCUAA) dio como resultado 248 *hits* que fueron empleados como consulta para la búsqueda de secuencias homólogas dentro de los genomas de 21 especies de Ustilaginales; como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, esta búsqueda finalmente resultó en dos regiones ortólogas localizadas en todos los genomas examinados con la secuencia del dominio templete putativo conservada. De acuerdo con la anotación genómica y búsqueda en las bases de datos se determinó que la primera secuencia que correspondía al *hit* con mayor puntuación pertenecía a un fragmento del gen de ARN ribosomal 18S el cual se encuentra altamente conservado en el filo Basidiomycota por lo cual fue descartado. Por otro lado, el segundo *locus* que se localizó en una región intergénica, presentó la secuencia del dominio templete localizada hacia el extremo 5' de la región y sería capaz de producir el mismo repetido telomérico en todos los miembros del orden de los Ustilaginales examinados, mientras una inspección rápida de esta región intergénica de *U. maydis* permitió identificar río abajo del dominio templete putativo una región transcrita rica en residuos de U y A, y hacia el extremo 3' una región rica en residuos de U, ya que dichos elementos se asemejan en secuencia y orientación a dominios característicos de TER en hongos y levaduras (Gunisova et al., 2009; Seto et al., 1999; Y. Tzfati et al., 2003), hipotetizando que esta región intergénica denominada *ter1* corresponde al *locus* que alberga el gen de la subunidad de ARN de la telomerasa en *U. maydis*, por lo tanto fue seleccionada para continuar con los análisis posteriores.

7.2. Análisis *In silico* del *locus ter1* en Ustilaginales

Con la región intergénica identificada extendimos el análisis comparativo genómico en ambas direcciones de este *locus* para identificar ORFs ortólogos y generar el mapa de sintenia (Figura 6), en el que se observa que el *locus* que contiene el dominio templete putativo se localiza en una región altamente conservada con presencia de ORFs ortólogos a lo largo del grupo taxonómico con ligeros eventos de inversiones y translocación de genes.

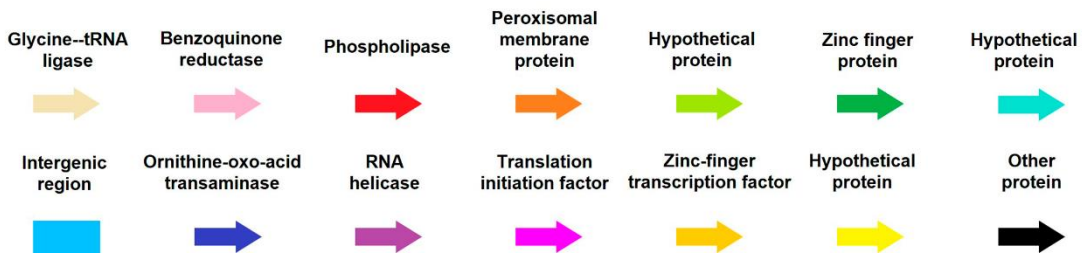
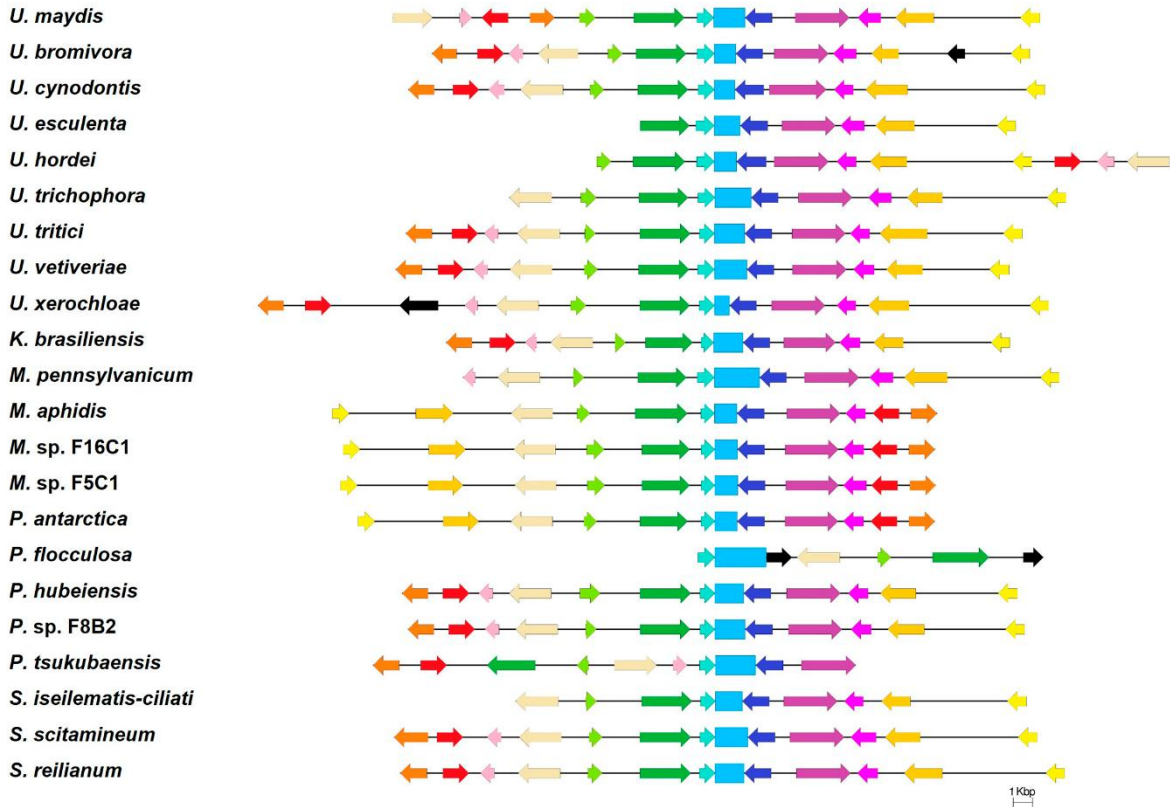


Figura 6. Mapa de sintenia del locus *ter1* en especies de Ustilaginales.

Representación de los genes que codifican para proteínas que se localizan en una región ampliamente conservada alrededor de la región intergénica (recuadro azul) donde se localiza el gen putativo *ter1*. La región muestra una alta conservación de la región genómica, donde se conservan ambos ORFs que flanquean a *ter1* (con la única excepción del ORF del extremo 3' en *P. flocculosa*) en todos los organismos examinados.

Con las secuencias de las regiones intergénicas se procedió a realizar el alineamiento múltiple de secuencias empleado el software MAFFT (Figura A2), en el cual además de observar una coincidencia perfecta del dominio templete putativo, como se había hipotetizado el alineamiento mostró que las regiones previamente observadas en *U. maydis* similares a los descritos para la actividad y biogénesis de TER en otros organismos también se encontraban presentes en todas las especies examinadas (Figura 7 y Tabla A1).

El primer elemento localizado río arriba del dominio templete fue el elemento conservado CE1, adyacente a éste se identificó el elemento CE2 que contiene la secuencia consenso (CGCCCYCC/GGYGGGCG), este elemento se localiza a una distancia promedio de 119 pb del templete (posición 141–148 en *U. maydis*) y que de acuerdo con el programa MatInspector by Genomatix (Cartharius et al., 2005) podría funcionar como sitio de unión potencial para proteínas ZF y en consecuencia desempeñar el papel de región promotora. En la posición 221–228 en *U. maydis* se localizó el tercer elemento denominado CE3 de función desconocida. Río abajo del dominio templete se localizó una región que contienen residuos continuos de uracilo y adenina de manera similar a las regiones CS3 y CS4 de levaduras y hongos filamentosos respectivamente (Gunisova et al., 2009; Kuprys et al., 2013; Y. Tzfati et al., 2003), si bien esta región muestra una baja conservación de secuencias con alta presencia de inserciones y deleciones entre estos residuos, la importancia de esta región y presencia de estas bases para la formación de triples bases U-A•U y actividad catalítica (Theimer et al., 2005; Y. Tzfati et al., 2003), nos hace suponer que efectivamente los residuos 126,810–126,840 conforman el tallo 1 y el bucle 1 del dominio pseudonudo, mientras la región hipervariable 126,841–126,851 podría corresponder al bucle 2 cuya secuencia nucleotídica es poco conservada y resulta dispensable en hTR y TLC1 (J. L. Chen & Greider, 2005; Qiao & Cech, 2008; Tesmer et al., 1999), mientras el tramo de residuos 126,852–126,860 es parte del tallo 2 (Figura 8C). En el extremo 3' se identificó otro motivo conservado que se asemeja a la secuencia AAGAGTTGGGCTCTG de la hélice P6.1 de los dominios CR4/5 de TER en vertebrados (J. L. Chen et al., 2000; Xie et al., 2008) y al igual que ésta, es capaz de plegarse en una estructura de tallo y asa (Figura 8B), la presencia de una estructura de hélice análoga a P6.1 es apoyada por los resultados de J. L. Chen et al. (2002) y N. K. Kim et al. (2010), que además de coincidir en localización hacia el extremo 3' de igual forma contiene residuos de U, blancos de modificaciones posiblemente críticas para la actividad catalítica. Por último, hacia el final del extremo 3' se identificó la secuencia consenso AAU₅₋₆CY que se localiza a una distancia promedio de 1,127 pb de CE2 con la menor distancia en *U. xerochloae* de 539 pb y la mayor distancia de 1,941 pb en *P. flocculosa*, y se asemeja al sitio Sm7 (AAU₅G) de TER en *Saccharomyces*, y es un elemento requerido para la unión del complejo de proteínas Sm7, maduración y estabilización del complejo

telomerasa, por lo cual es un sitio esencial para la correcta acumulación y función del complejo en levaduras (Leonardi et al., 2008; Seto et al., 1999).

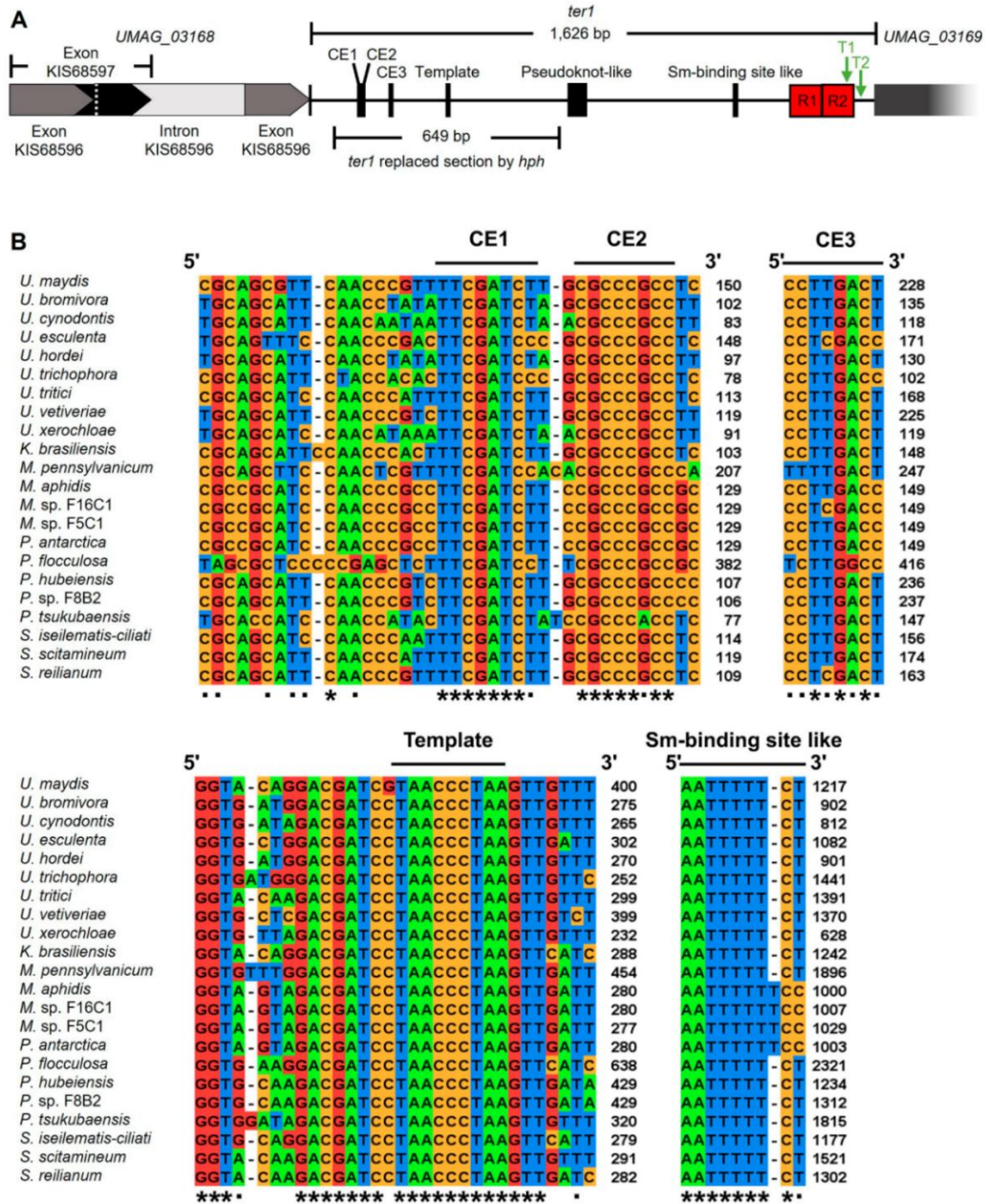


Figura 7. Motivos conservados dentro del locus *ter1*.

(A) Representación esquemática de *UMAG_03168* y de la región intergénica *ter1*. En la parte superior se muestra la distribución de los exones que conforman las isoformas de *UMAG_03168*, la localización de los motivos conservados dentro de *ter1* (B) Alineamiento múltiple de secuencias ortólogas de *ter1*. Las regiones intergénicas contienen secuencias características de TER, la secuencia del dominio templete putativo se encuentra conservada en todos los organismos examinados, en el extremo 5' de la región se identificaron tres elementos conservados (CE), hacia el extremo 3' de la región se identificó la secuencia consenso AAU₅₋₆CY, que se asemeja al sitio Sm de TLC1 en *S. cerevisiae*, por lo que podría corresponder al extremo final del transcrito maduro de *ter1*.

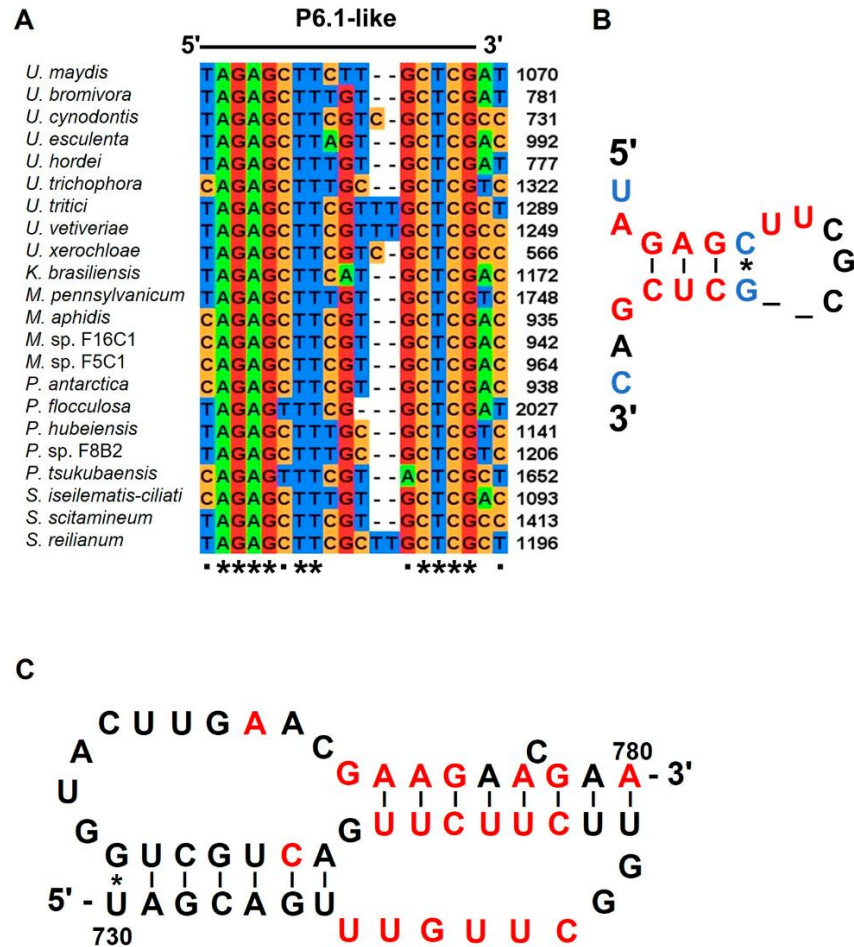


Figura 8. Plegamiento de dominios estructurales conservados en especies de Ustilaginales.

(A) Alineamiento múltiple de secuencias de la región similar a P6.1 (B) Estructura secundaria consenso de acuerdo con el programa RNAalifold. Nucleótidos conservados en todas las especies son representados en rojo. Transición de nucleótidos entre especies es representado en azul. Apareamiento de bases sustentados por covariaciones son mostrados con asteriscos. (C) Estructura secundaria del dominio pseudonucleo. Los nucleótidos rojos representan los residuos conservados en al menos el 80% de las especies.

Continuando con el escrutinio de la región intergénica, la búsqueda de sitios consenso dentro de la región intergénica que sugirieran el procesamiento en el extremo 3' por medio de empalme no rindió resultados, dos repetidos de 90 pb denominados TRR1 (Telomerase RNA Repeat 1) y TRR2 (Telomerase RNA Repeat 2) que comparten 96.67% de identidad fueron identificados en el extremo 3' (Figura 7A) en la posición 1,380–1,469 y 1,472–1,561, respectivamente y de localización exclusiva en *U. maydis*.

Por otro lado, la búsqueda de señales de poliadenilación reportadas por Doyle et al. (2011) localizadas en *cis* y río abajo del primer exón de *UMAG_03168* o dentro de la región intergénica de *U. maydis* resultó en la identificación del motivo 5'-AGTAAA-3' localizado dentro de TRR2 en la posición 1537-1542 y río abajo de TRR2 en la posición 1578-1583 (T1 y T2 respectivamente), mientras la primera secuencia se localiza en una región no conservada, la segunda secuencia que se encuentra en una región rica en residuos de A y en consecuencia podría corresponder al sitio de poliadenilación del gen de TER (Figuras 7A y A3).

7.3. Ensamblaje de la secuencia de interrupción para *ter1*

La actividad transcripcional del *locus* es apoyada por los reportes de diversos autores sobre la presencia de ESTs en esta región (Doyle et al., 2011; Ho et al., 2007; Morrison et al., 2012; Nugent et al., 2004) lo que confirma que esta región es capaz de transcribirse y desempeñar un papel biológico, en consecuencia, para corroborar su función como componente de ARN de la telomerasa se prosiguió a ensamblar la secuencia de interrupción y obtener las respectivas mutantes. El ensamble del casete de interrupción se realizó de acuerdo con el diagrama mostrado en la Figura 9, los pares de oligonucleótidos Cr8S1-5 y Cr8S1-3 (Tabla 3) fueron utilizados para amplificar los fragmentos de 1,181 pb y 1,175 pb que corresponde a los extremos flanqueantes 5' y 3' al sitio blanco donde se localiza el dominio temple.

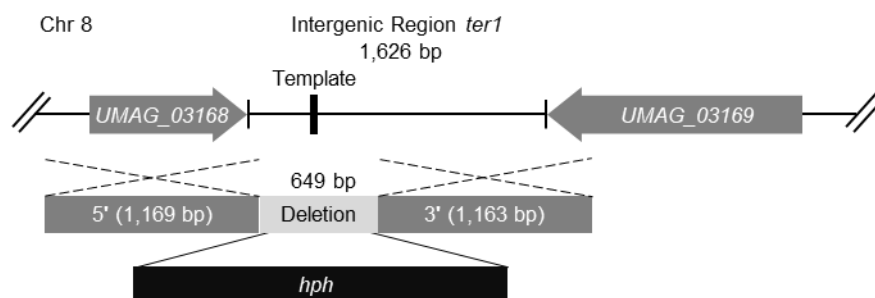


Figura 9. Localización genómica de la secuencia intergénica *ter1* y estrategia de interrupción del gen *ter1* en la cepa 518 de *U. maydis*.

Se amplificaron fragmentos superiores a 1,000 pb flanqueantes a la región blanco de 649 pb donde se localizó el dominio templete putativo que fue reemplazada por la secuencia del marcador de selección que confiere resistencia a higromicina.

Posteriormente se clonaron en el vector pBluescript II KS (-) previamente linealizado con *EcoRV* (Figura 10A) obteniendo los plásmidos pTer-5' de 4,139 pb y pTer-3' 4,133 pb, la secuencia y orientación de los insertos fue comprobada mediante perfil de restricción (Figuras 10B y 10C) y secuenciación (datos no mostrados). Una vez verificada la integridad de las construcciones, el plásmido pTer-5' se sometió a doble digestión con *NotI/BamHI* para liberar el fragmento de interés de 1,170 pb que corresponde al extremo flanqueante 5'.

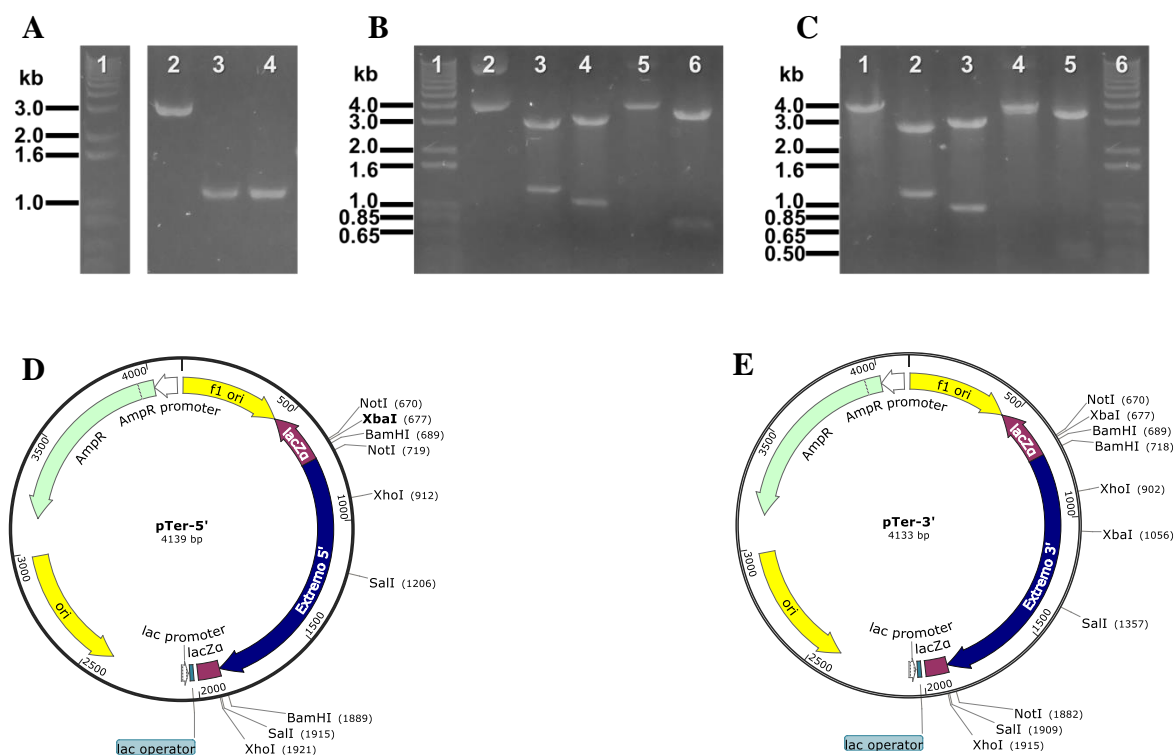


Figura 10. Electroforesis de los elementos del casete de interrupción y perfil de restricción de las construcciones pTer-5' y pTer-3'.

(A) Vector de clonación pBluescript II KS (-) linealizado (carril 2) y amplificación de los extremos flanqueantes 5' y 3' del dominio template (carriles 3 y 4). (B y D) Perfil de restricción y diagrama del plásmido pTer-5', digestiones con *NotI*, *BamHI*, *XhoI*, *XbaI* y *SalI* (Carriles 2–6). (C y E) Perfil de restricción y diagrama del plásmido pTer-3', digestiones con *BamHI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI* y *SalI* (Carriles 1–5).

A continuación, el plásmido pTer-3' fue digerido parcialmente con *NotI*, para generar fragmentos de 4,133 pb, 2,921 pb y 1,212 pb, la banda de 4,133 que corresponde al vector linealizado fue purificada y digerida con *BamHI* liberando fragmentos de 4,085 pb, 2,940 pb, 1,164 pb, 29 pb y 19 pb, por último, la banda de 4,085 pb que contiene los sitios *NotI/BamHI* fue escindida del gel y purificada para ser empleada como vector para la subclonación del extremo 5' (Figura 11A).

La construcción resultante pTerSub5' de 5,255 pb fue sometida a perfil de restricción con *XhoI*, *NotI* y *BamHI*, obteniendo los fragmentos esperados de 3,081 pb, 1,161 pb y 1,013 pb, 2,921 pb y 2,334 pb, y 5,255 pb que corresponden a los tamaños esperados en cada digestión (Figuras 11B y 11C).

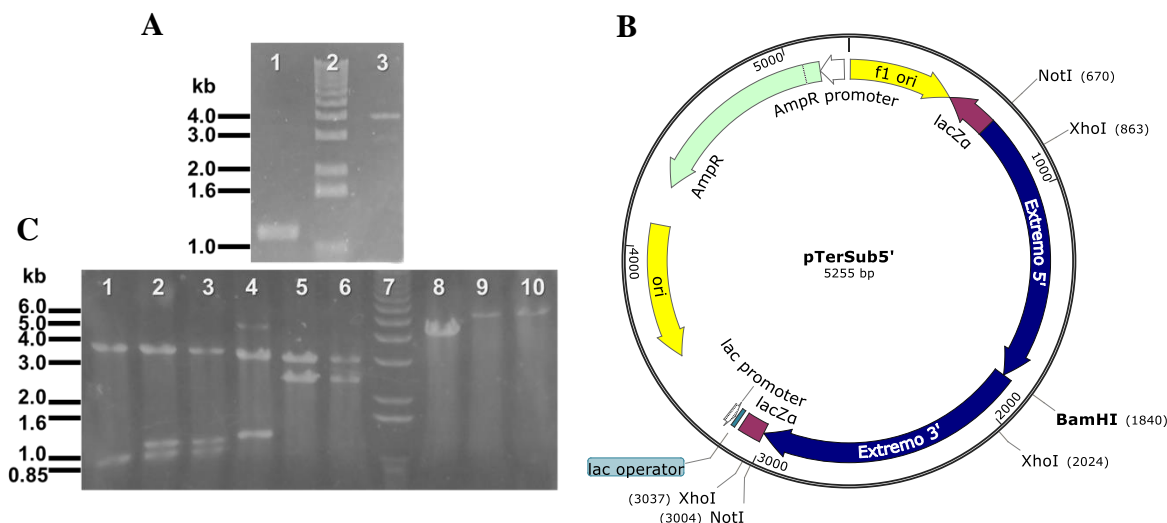


Figura 11. Análisis de restricción de la construcción pTerSub5'.

(A) Electroforesis de los fragmentos para la subclonación del extremo 5' en pTer-3', fragmento 5' (Carril 1) y del vector pTer-3' con los extremos cohesivos *NotI/BamHI* (Carril 3). (B y C) Diagrama de la construcción y perfil de restricción de pTerSub5', digestiones de pTer-3' con *XhoI*, *NotI* y *BamHI* empleadas como control (Carriles 1, 4 y 8 respectivamente), digestiones de pTerSub5' con *XhoI* (Carriles 2 y 3), *NotI* (Carriles 5 y 6) y *BamHI* (Carriles 9 y 10).

A continuación, los plásmidos pTerSub5' y pCM1007 fueron digeridos en su totalidad con *BamHI*, para linealizar el vector y liberar el fragmento de 2,045 pb que contiene el gen *hph* usado como marcador de selección, ambas bandas de interés fueron escindidas y purificadas (Figura 12A), el vector fue desfosforilado y se llevó a cabo la ligación del inserto, resultando en el plásmido pTer1 de 7,294 pb que fue sometido a perfil de restricción para corroborar la presencia y orientación del inserto (Figuras 12B y 12C).

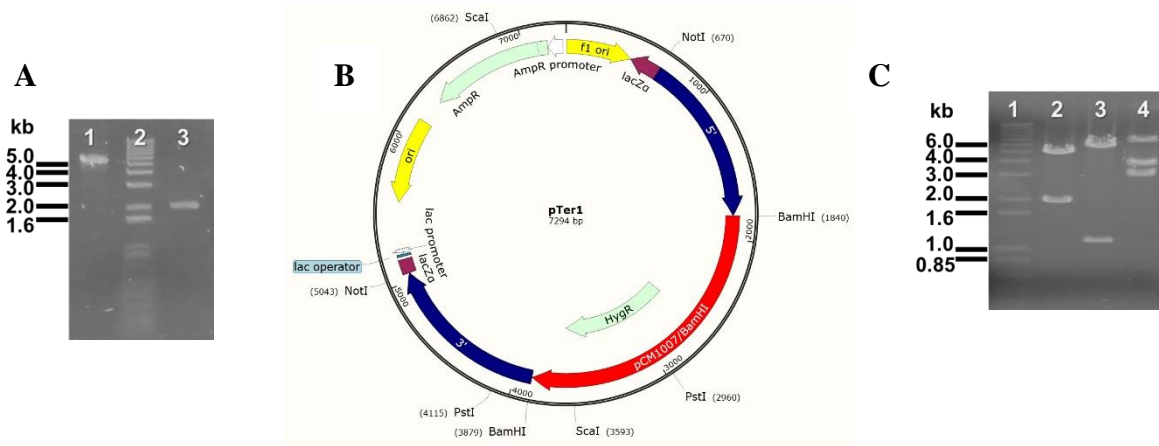


Figura 12. Análisis de restricción de la construcción pTer1.

(A) Electroforesis de pTerSub5' linealizado (Carril 1) y del fragmento *Bam*HI de pCM1007 (Carril 3). (B) Diagrama de la construcción y perfil de restricción de pTer1, digestiones de con *Bam*HI, *Pst*I y *Sca*I (Carriles 2, 3 y 4 respectivamente).

7.4. Obtención de mutantes *ter1::hph*

El plásmido pTer1 fue digerido por completo con *Not*I para liberar la secuencia de 4,373 pb (Figuras 12B y 13A) para la interrupción de *locus* por recombinación homóloga, con el fragmento escindido y purificado (Figura 13B) se llevó a cabo la transformación de los protoplastos y crecimiento bajo presión de selección como se describe previamente, las transformantes recuperadas fueron sembradas en placas YEPS sin antibiótico a fin de descartar eventos de retención extra-cromosomal, y posteriormente se crecieron nuevamente en medio adicionado con higromicina, a continuación las colonias cosechadas fueron inoculadas en medio liquido YEPS, los paquetes celulares se recolectaron mediante centrifugación para preparar alícuotas de las muestras con glicerol (50% v/v) para su almacenamiento a -70°C y la fracción restante fue usada para realizar la extracción de ADN total para los ensayos de PCR.

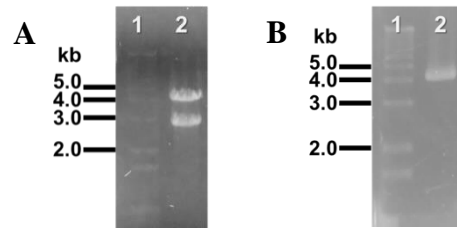


Figura 13. Análisis de restricción de la secuencia de interrupción para *terI* derivada de pTer1.

(A) Fragmentos producidos de la digestión de pTer1 con *NotI*. (B) Purificación de la secuencia de interrupción para *terI*.

Como resultado cuatro transformantes fueron conservadas y con las respectivas muestras de ADN a fin de determinar el remplazo de la secuencia blanco e incorporación de la secuencia del marcador de selección se emplearon los pares de oligonucleótidos WT-114-Upp y WT-114-Low para los ensayos de PCR, obteniendo los amplificados esperados de 2,362 pb en la cepa silvestre y de 3,758 pb en las transformantes (Figuras 14A y 14C). Para corroborar que el incremento observado del tamaño del amplificado correspondía a la inserción de gen *hph*, se emplearon en ambos extremos del sitio de recombinación pares de oligonucleótidos que alinean sobre la secuencia del gen *hph* y fuera de los sitios de recombinación, obteniendo los amplificados esperados de 1,757 pb y 3,004 pb para los extremos 5' y 3' respectivamente, así como la ausencia de amplificado en la cepa silvestre y controles negativos (Figuras 14A y 14B). Por último, se usaron los pares de oligonucleótidos Template-Upp y Template-Low para comprobar la ausencia de un fragmento que contiene al dominio templete localizado en la secuencia blanco por lo que solo se obtuvo el amplificado esperado de 244 pb en la cepa silvestre y la falta de amplificado en el control negativo y las transformantes interrumpidas (Figuras 14A y 14C).

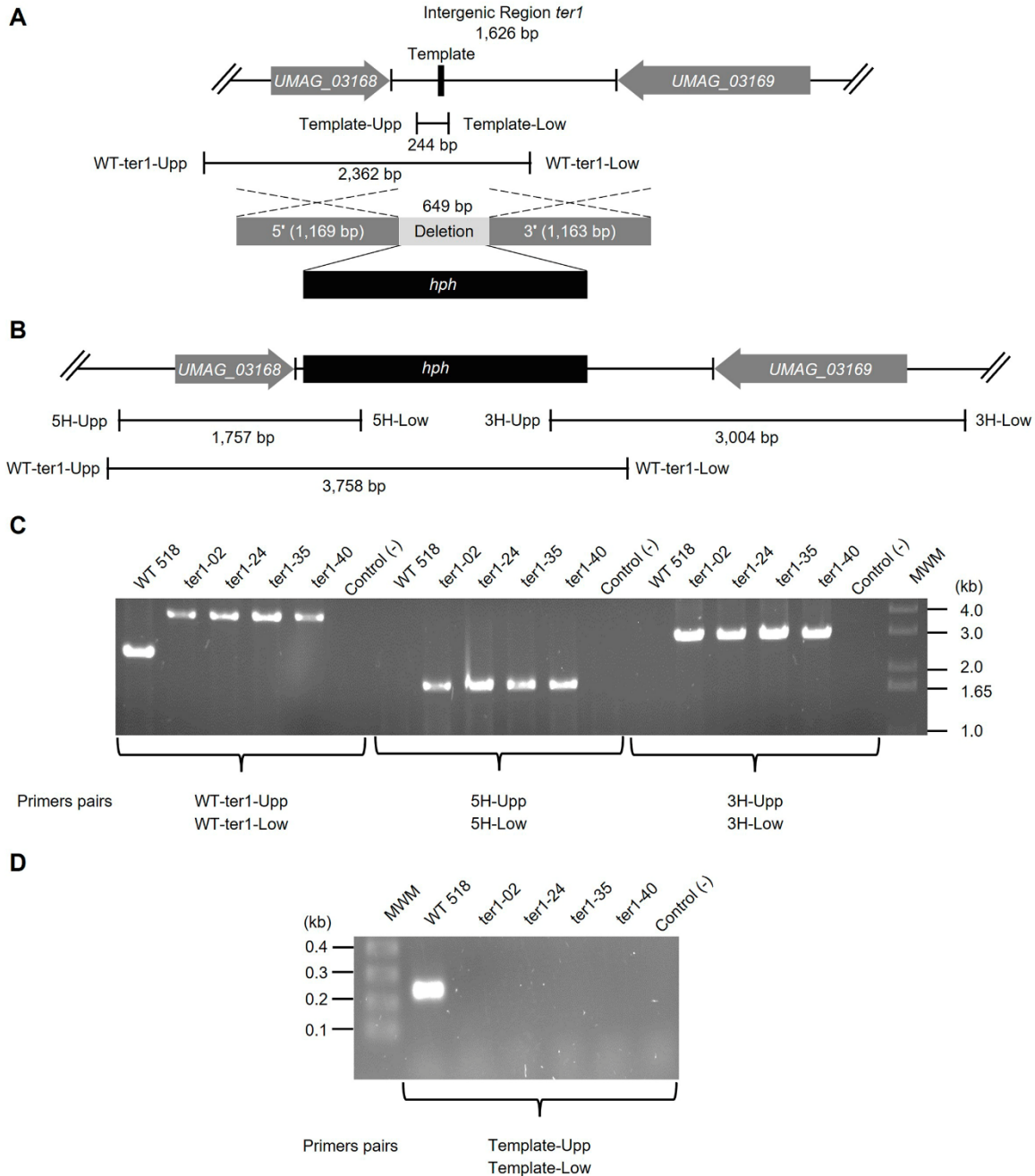


Figura 14. Ensayos de PCR para confirmar la correcta integración de la secuencia de interrupción del locus *ter1* por HR.

(A) Diagramas del alineamiento de los oligonucleótidos diseñados para comprobar la integridad del locus *ter1* en la cepa silvestre 518 y remplazo de la secuencia blanco con la secuencia del gen *hph*. Locus *ter1* cepa silvestre 518 (panel superior), locus *ter1* mutantes interrumpidas (panel inferior). (B) El remplazo de locus fue analizado en 4 transformantes: *ter1-02*, *ter1-24*, *ter1-35* y *ter1-40*, las transformantes interrumpidas muestran un incremento en el tamaño del amplificado que corresponde al tamaño del remplazo de la secuencia blanco por el gen *hph*. La cepa silvestre produce el amplificado esperado de 2,362 pb con el par de oligonucleótidos WT-*ter1*-Upp/WT-*ter1*-Low, el control negativo no produce amplificado, la integración de la secuencia de marcador de selección fue comprobada por ambos extremos del sitio de recombinación, pares de oligonucleótidos que alinean dentro de la secuencia del gen *hph* y fuera de los sitios de recombinación fueron utilizados.

Amplificados del tamaño esperado fueron obtenidos en las mutantes *ter1::hph*, en la comprobación de la integración desde el extremo 5' se obtuvieron los amplificadores esperados de 1,757 pb con el par de oligonucleótidos 5H-Upp/5H-Low, para el extremo 3' se obtuvieron los amplificadores esperados de 3,004 pb con el par de oligonucleótidos 3H-Upp/3H-Low, no se obtuvieron amplificadores en la cepa silvestre y controles negativos. (C) Comprobación de la ausencia de la secuencia blanco, se empleó el par de oligonucleótidos Template-Upp/Template-Low que alinean dentro de la región eliminada, el fragmento de 244 pb que corresponde al tamaño esperado fue obtenido en la cepa silvestre, no se obtuvieron amplificadores en las mutantes interrumpidas *ter1-02*, *ter1-24*, *ter1-35* y *ter1-40* y en el control negativo.

7.5. Análisis fenotípico de las mutantes *ter1::hph*

Después de comprobar la integración y estabilidad mitótica de la secuencia de interrupción se continuó con el análisis fenotípico de las mutantes, si bien las cuatro mutantes obtenidas mostraron un fenotipo senescente durante las resiembras consecutivas, consistente con la pérdida de la viabilidad celular, la disminución progresiva de la capacidad replicativa se detuvo en la 12 resiembra que coincide con la formación de las células supervivientes como se demuestra más adelante, observando que la pérdida de la viabilidad sostenida fue más acentuada en la mutante *ter1-24* a diferencia de las mutantes restantes que mostraron un patrón de crecimiento atenuado similar, en consecuencia esta mutante en conjunto con la cepa *ter1-02* fueron seleccionadas para examinar si además de estas características contrastantes se presentaban algunas otras diferencias entre ambas mutantes y determinar las posibles causas. Una vez observada la estabilidad en el crecimiento de las mutantes se procedió a efectuar diluciones seriadas que fueron vertidas sobre placas de medio YEPS y MC, además de cultivos en medio líquido YEPS para ser observados al microscopio, como se observa en la Figura 15A la delección de *ter1* produce una disminución en el número y tamaño de las colonias sin importar el medio, y se corrobora que la pérdida de la viabilidad celular en la mutante *ter1-24* es mayor. Por otro lado la cepa silvestre mostró una morfología celular normal con bordes uniformes, en contraste las mutantes *ter1::hph* mostraron la presencia de células elongadas y de bordes irregulares (Figura 15B) y en menor medida se observaron alteraciones en el ángulo de gemación en las células madre y formación de aberraciones cromosómicas (Posadas-Gutiérrez, 2020).

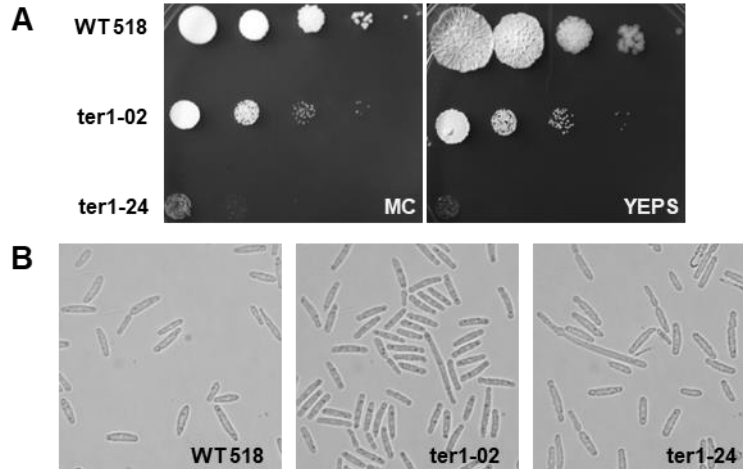


Figura 15. Alteraciones fenotípicas producidas por la interrupción de *ter1* en *U. maydis*.

(A) Diluciones seriadas de las cepas fueron vertidas sobre medio YEPS y MC e incubadas por 2 días a 28 °C. Las mutantes *ter1::hph* muestran un decremento dramático en la formación y el tamaño de las colonias, consistente con la pérdida de actividad de la telomerasa descrita en otros organismos. (B) Morfología celular de la cepa WT 518 y *ter1::hph*, la interrupción de *ter1* provoca alteraciones en la morfología celular, la mutantes presentan células de bordes irregulares y un incremento en la presencia de células elongadas con alteraciones en el ángulo de gemación, que sugieren defectos en la regulación del ciclo celular.

A fin de determinar el tiempo de generación de las mutantes, se llevaron a cabo las cinéticas de crecimiento a partir de cultivos en fase estacionaria, se inocularon matraces que fueron muestreados cada 2 horas, como resultado en las mutantes se obtuvo un notable decremento de la densidad óptica de los cultivos y en la disminución de las unidades formadoras de colonias en comparación con la cepa silvestre (Figura 16), mientras la cepa silvestre alcanza la fase estacionaria alrededor de las 12 horas de incubación con un tiempo de generación estimado de 117 minutos que corresponde al tiempo esperado para esta cepa, las mutantes *ter1-02* y *ter1-24* continúan en fase exponencial después de 18 horas de incubación y exhiben un incremento en el tiempo de duplicación estimado en 176 y 205 minutos respectivamente, en consecuencia se puede afirmar que la ausencia de Ter1 afecta el tiempo de generación y el potencial replicativo, para establecer si dichos eventos son a causa de alteraciones en el extremo cromosomal propiciados por los eventos de recombinación o cambios en el patrón de expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, se continuo con el análisis del TRF y el análisis transcripcional de las mutantes.

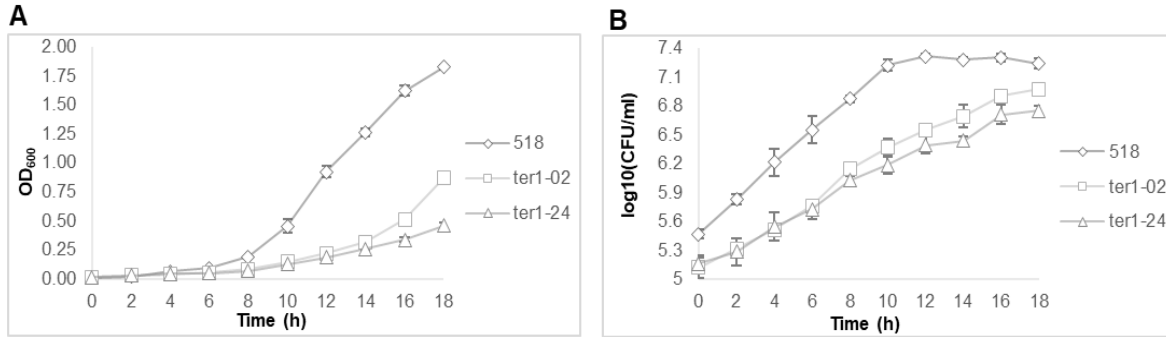


Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa WT 518 y mutantes *ter1::hph*.

Las cepas fueron crecidas en medio líquido YEPS a 28°C durante 18 horas y muestreadas cada dos horas. (A) Densidad óptica a 600 nm. (B) Unidades formadoras de colonias.

7.6. Análisis del fragmento terminal de restricción

Una vez comprobada la identidad de las mutantes seleccionadas, muestras tomadas de los viales de glicerol fueron sometidas a resiembras continuas, el análisis del TRF de las mutantes y de la cepa silvestre fue efectuando como se describe previamente, haciendo uso de la sonda del repetido telomérico (TTAGGG₃₇) obtenida de la digestión total del plásmido pUT2 con *Pst*I, en la Figura 17 se observa que mientras en la cepa silvestre 518 (Carriles 1) el patrón de hibridación se localiza principalmente entre los 0.5 kb y 1 kb, semejante al observado previamente en esta cepa (Bautista-Espana et al., 2014; Yu et al., 2018), para la sexta resiembra que corresponde alrededor de la generación 108 en las mutantes el patrón de hibridación ya se localiza por debajo de los 0.65 kb y continua con una disminución gradual hasta la resiembra número 11 (Figuras 17A y 17B).

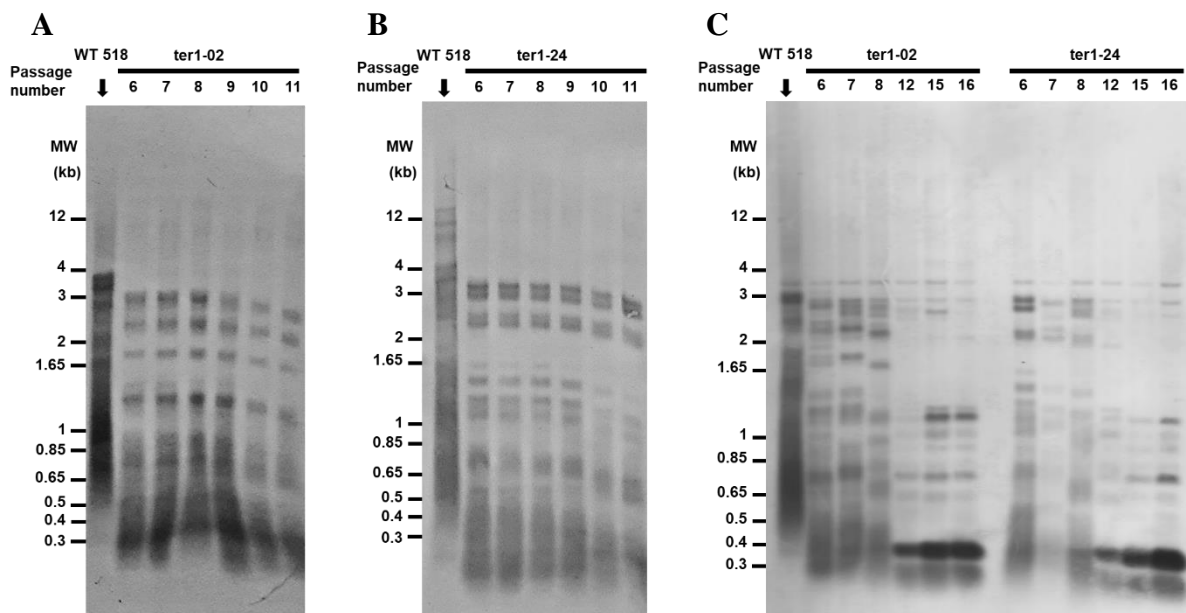


Figura 17. Análisis del fragmento terminal de restricción de la cepa WT 518 y mutantes *ter1::hph*.

La pérdida de *ter1* desencadena un acortamiento progresivo del TRF y eventualmente conduce al surgimiento de células supervivientes que muestran la amplificación de un fragmento de 350 pb y de múltiplos de este elemento. (A y B) TRF de las mutantes *ter1-02* y *ter1-24*, los cultivos comenzaron a las 108 generaciones aproximadamente y fueron recolectados continuamente cada 24 periodos de duplicación hasta la resiembra 11 (228 generaciones). (C) TRF de las mutantes *ter1::hph*, resiembras 6–8 y 12, 15 y 16, alrededor de las 252 generaciones se observa la aparición de rearrreglos en el TRF y la amplificación principalmente de un fragmento ~350 pb y de dos principales bandas que corresponden a múltiplos de este elemento.

Lo anterior es consistente con el acortamiento progresivo de la longitud de los telómeros, para la duodécima resiembra (aproximadamente 252 generaciones, Figura 17C) se produce la amplificación progresiva de un fragmento de ~350 pb así como también la aparición de otras bandas discretas que asemejan el patrón de hibridación característico de supervivientes tipo I en *U. maydis* (Yu et al., 2018), donde las dos principales bandas observadas corresponden a múltiplos de ~350 pb (Figura 17C, resiembras 15 y 16), estos resultados confirma el requerimiento de *ter1* para el mantenimiento de la longitud de los telómeros.

7.7. Ensayos de infección en plantas de maíz

A fin de determinar la contribución de *ter1* en el desarrollo patogénico y ciclo de vida del hongo, ensayos de infección en plantas de maíz se llevaron a cabo con cruza de ambas mutantes *ter1* y su cepa complementaria 518, como control positivo se empleó una cruza de cepas silvestres complementarias.

Aunque en ambos casos se observó la aparición de clorosis en las hojas alrededor de los 5 dpi (Figura 18A), la aparición de clorosis en las plantas inoculadas con cruza heterocigotas de $ter1^-$ ocurrió en menor intensidad y porcentaje (48.03% para el control positivo contra el 36.03% y 37.12% para las cruza de la mutante $ter1-02$ y $ter1-24$ respectivamente), y al contrario del control la formación de antocianinas durante el desarrollo de la infección es apenas perceptible en las cruza heterocigotas (Figura 18C), para los 21 dpi en el control positivo cerca del 90% de la plantas presentaron clorosis, mientras en un 65% se observó la formación de tumores y en el 35% la presencia de tumores con teliosporas. Por el contrario, en ambos casos en las cruza heterocigotas se contabilizó aproximadamente un 47% de plantas con clorosis y otro 47% de plantas sin la presencia de síntomas de infección que contrastan ampliamente con el 4% observado con las cruza silvestres, por lo que se concluye que *ter1* desempeña un papel crucial para el desarrollo infectivo y conclusión del ciclo de vida.

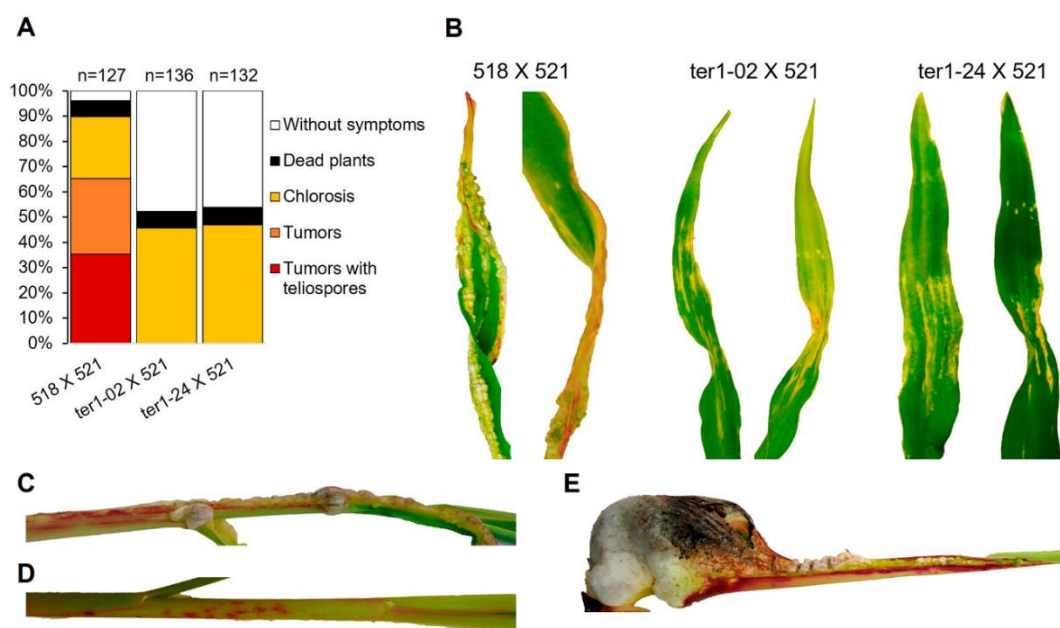


Figura 18. Desarrollo de la infección en plantas de maíz causada por cruza silvestres y cruza heterocigotas $ter1^+/ter1^-$ de *U. maydis*

(A) Cuantificación de los síntomas de los ensayos de infección en plantas. Los síntomas de la infección se evaluaron a los 21 dpi, los porcentajes finales representan el promedio obtenido de tres ensayos independientes. Como control positivo se empleó una cruza de 521 X 518, mutantes $ter1::hph$ fueron cruzadas con su cepa complementaria 521. (B) Desarrollo de clorosis a los 5 dpi en las hojas de las plantas del control positivo y hojas de las plantas inoculadas con las cruza heterocigotas $ter1^-$. (C y D) Detalle de los tallos y formación de antocianinas a los 21 dpi en planta inoculada con las cruza de cepas silvestres y en planta inoculada con las cruza heterocigotas $ter1^-$, respectivamente. (E) Tumor desarrollado por las cruza silvestres a los 21 dpi.

7.8. Control de calidad de las lecturas de RNA-Seq

De las nueve librerías de RNA-Seq generadas que incluyen tres réplicas de cada cepa, se obtuvo un total de 126,587,419 pares de lecturas, después de remover los adaptadores y del filtrado de calidad, 110,227,520 pares de lecturas con calidad superior a Q30 fueron conservadas (Tabla 4 y Figura A4). Adicionalmente a fin de obtener más información acerca de la abundancia de transcritos en *U. maydis* originados por las diversas vías de transcripción, se decidió ensamblar los transcriptomas de la cepa silvestre 521 de la fracción nuclear de transcritos polyA⁺ y de la fracción nuclear de transcritos totales (transcritos polyA⁺ y transcritos polyA⁻) ribodepletada, como paso previo para la extracción de RNA-Seq se llevó a cabo la extracción de núcleos (Anastacio-Marcelino, no publicado), seguida de la construcción de las librerías que fueron generadas empleando los kits TruSeq Stranded mRNA Library Preparation kit y Truseq Stranded Total RNA Gold Prep Kit (Illumina Inc.) respetivamente, la secuenciación estuvo a cargo de DN Link Inc., usando la plataforma Illumina NovaSeq 6000, para obtener lecturas de tipo paired-end de 101 pb. Para el filtrado y control de calidad se emplearon los mismos parámetros descritos anteriormente, como paso adicional se incluyó el uso del software SortMeRNA v4.2.0 (Kopylova et al., 2012) con los parámetros por defecto, haciendo uso de las secuencias de ARNr y del genoma mitocondrial de *U. maydis* para la eliminar las secuencias remanentes de ARNr y ADNmt. Como resultado se obtuvieron 116,733,680 pares de lecturas crudas para la muestra de transcritos poliadenilados y 72,025,740 para la muestra de transcritos totales, después del control de calidad y ambos filtrados en la muestra de transcritos poliadenilados se descartaron el 11.94% de lecturas conservando un total de 102,794,159 pares de lecturas, mientras que para la muestra de transcritos totales a causa de la alta abundancia de transcritos mitocondriales como resultado de la persistencia de mitocondrias en los precipitados de la fracción nuclear como se discute más adelante, se eliminaron el 70.05% de las lecturas conservando un total de 21,572,997 pares de lecturas (Tabla 5 y Tabla A2).

Tabla 4. Librerías de RNA-seq y control de calidad de las muestras de la cepa silvestre 518 y mutantes *ter1::hph*.

Librería	Número de pares de lecturas crudas	Después del filtrado de calidad	
		Número de pares de lecturas conservadas	% de lecturas eliminadas
WT-518-A	13,538,663	11,844,158	12.52
WT-518-B	20,174,343	17,737,862	12.08
WT-518-C	13,628,269	12,015,662	11.83
ter1-02-A	14,006,402	12,037,350	14.06
ter1-02-B	12,994,871	11,273,144	13.25
ter1-02-C	12,042,864	10,166,164	15.58
ter1-24-A	11,844,249	10,315,780	12.90
ter1-24-B	14,399,415	12,593,915	12.54
ter1-24-C	13,958,343	12,243,485	12.29
Total	126,587,419	110,227,520	12.92

Tabla 5. Librerías de RNA-seq y control de calidad de las muestras de la fracción nuclear de la cepa silvestre 521.

Librería	Número de pares de lecturas crudas	Después del filtrado		Después del filtrado con SortmeRNA		% Total de lecturas eliminadas
		Número de pares de lecturas conservadas	% de lecturas eliminadas	Número de pares de lecturas conservadas	% de lecturas eliminadas	
WT-521-polyA ⁺ -A	41,845,456	39,134,699	6.48	36,798,600	5.97	12.06
WT-521-polyA ⁺ -B	35,613,788	33,383,598	6.26	32,333,192	3.15	9.21
WT-521-polyA ⁺ -C	39,274,436	36,731,913	6.47	33,662,367	8.36	14.29
Total	116,733,680	109,250,210	6.41	102,794,159	5.91	11.94
WT-521-Total-A	19,110,343	17,596,593	7.92	4,778,065	72.85	75.00
WT-521-Total-B	23,857,473	22,745,060	4.66	7,343,309	67.71	69.22
WT-521-Total-C	29,057,924	27,900,728	3.98	9,451,623	66.12	67.47
Total	72,025,740	68,242,381	5.25	21,572,997	68.39	70.05

7.9. Ensamblaje del transcriptoma de la fracción nuclear y análisis de calidad

Con el fin de obtener más información acerca de la transcripción y procesamiento del *locus ter1*, así como su abundancia dentro de la fracción nuclear, las lecturas procesadas con $Q \geq 30$ fueron utilizadas para realizar un ensamble *De novo* empleado el programa Trinity v2.11.0, bajo los siguientes parámetros: Trinity --seqType fq --max_memory 30G --samples_file samples.txt --CPU 12 --min_kmer_cov=2 --min_contig_length=100 --jaccard_clip --SS_lib_type RF --output Trinity_output_dir.

A continuación, para la obtención de la puntuación y estadísticas del ensamble se empleó el programa TransRate v1.0.3 (Smith-Unna et al., 2016) usando como referencia las secuencias de proteínas de *U. maydis*, con los parámetros que se muestran a continuación: \$ transrate --assembly Trinity.fasta --left output_sample1_R1.fastq,...,output_sampleN_R1.fastq --right output_sample1_R2.fastq,...,output_sampleN_R2.fastq --reference input_Umaydis521_2.0_protein.faa --threads 12 --output TransRate_output_dir > align_stats_transrate.txt. Como resultado se ensamblaron 32,408,825 bases que generaron 42,711 transcritos con una longitud promedio de 693 pb, N50 de 2,932 pb y un contenido de GC del 55%, este ensamble obtuvo una cobertura del 0.90 del proteoma, una puntuación de 0.0233 y una puntuación optimizada de 0.1786 (Tabla 6).

Tabla 6. Estadísticas y puntuación del ensamble obtenido con TransRate para el transcriptoma de las fracciones nucleares de la cepa WT-521.

Contig metrics:		Read mapping metrics:		Comparative metrics:	
n seqs	42711	fragments	124367156	CRBB hits	12585
smallest	101	fragments mapped	60450937	n contigs with CRBB	12585
largest	16788	p fragments mapped	0.49	p contigs with CRBB	0.29
n bases	32408825	good mappings	57135867	rbh per reference	1.86
mean len	693.01	p good mapping	0.46	n refs with CRBB	6213
n under 200	21876	bad mappings	3315070	p refs with CRBB	0.92
n over 1k	9292	potential bridges	0	cov25	6019
n over 10k	31	bases uncovered	15940808	p cov25	0.89
n with orf	10006	p bases uncovered	0.49	cov50	5825
mean orf percent	64.08	contigs uncovbase	33455	p cov50	0.86
n90	648	p contigs uncovbase	0.78	cov75	5609
n70	1861	contigs uncovered	42711	p cov75	0.83
n50	2932	p contigs uncovered	1.0	cov85	5516
n30	4284	contigs lowcovered	42711	p cov85	0.81
n10	9553	p contigs lowcovered	1.0	cov95	5384
gc	0.55	contigs segmented	3797	p cov95	0.79
bases n	0	p contigs segmented	0.09	reference coverage	0.90
proportion n	0.0				
TRANSRATE ASSEMBLY SCORE				0.0233	
TRANSRATE OPTIMAL SCORE				0.1786	
TRANSRATE OPTIMAL CUTOFF				0.1929	
good contigs				15387	
p good contigs				0.36	

7.10. Representación de las lecturas

Para examinar la representación de cada una de las librerías sobre los transcritos reconstruidos y CDSs se hizo uso del programa Bowtie 2, utilizando el archivo Trinity.fasta y Ustilago_maydis.Umaydis521_2.0.cds.all.fasta como entrada para generar el índice para las lecturas de la fracción nuclear y para las lecturas de las mutantes *ter1::hph* y la cepa parental, respectivamente, de acuerdo con el siguiente comando: \$ bowtie2 -x index_file -1 output_sample1_R1.fastq -2 output_sample1_R2.fastq -p 12 -S output_sample1_bowtie2.sam 2> align_stats_bowtie2.txt. De las lecturas de las mutantes *ter1::hph* y la cepa parental se obtuvo una tasa total de alineamiento global del 77.12% (Tabla 7), entre tanto 50,233,900 de compañeros de pares de lecturas no forman parte de los alineamientos, posiblemente a que estos pares de lecturas corresponden a UTRs, secuencias intrónicas y transcritos de lncRNAs no contenidos en las secuencias de referencia.

Tabla 7. Porcentajes de alineamiento con Bowtie 2 de las librerías utilizadas para el análisis del transcriptoma de la cepa silvestre 518 y mutantes *ter1::hph*.

Sample	Mapping statistics description			Analyzing the non-aligned		overall alignment rate
	aligned concordantly 0 times	aligned concordantly exactly 1 time	aligned concordantly >1 times	aligned discordantly 1 time	mates make up the pairs, aligned 0 times	
ter1-02_1	5,505,067	6,373,511	158,772	880,762	6,236,467	74.10%
ter1-02_2	4,889,326	6,236,996	146,822	573,643	5,880,574	73.92%
ter1-02_3	5,667,219	4,383,001	115,944	1,833,249	4,969,456	75.56%
ter1-24_1	4,394,331	5,817,969	103,480	955,316	4,396,254	78.69%
ter1-24_2	5,243,795	7,198,605	151,515	1,216,112	5,098,764	79.76%
ter1-24_3	5,087,518	7,021,374	134,593	1,124,163	5,051,851	79.37%
WT-518_1	5,822,965	5,946,263	74,930	1,324,452	5,733,659	75.80%
WT-518_2	6,848,575	10,755,925	133,362	942,837	7,746,662	78.16%
WT-518_3	5,101,943	6,820,694	93,025	1,031,995	5,120,213	78.69%
Total	48,560,739	60,554,338	1,112,443	9,882,529	50,233,900	77.12%

Por otro lado, para las lecturas empleadas para el ensamble del transcriptoma nuclear se observó un incremento en la representación de las lecturas con una tasa total de alineamiento global del 99.41%, en contraste con las primeras librerías solo 1,452,976 de compañeros de pares de lecturas no alinean con las secuencias de referencia (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de alineamiento con Bowtie 2 de las librerías utilizadas para el ensamblaje del transcriptoma de las fracciones nucleares de la cepa silvestre 521.

Sample	Mapping statistics description			Analyzing the non-aligned		overall alignment rate
	aligned concordantly 0 times	aligned concordantly exactly 1 time	aligned concordantly >1 times	aligned discordantly 1 time	mates make up the pairs, aligned 0 times	
WT-521-polyA ⁺ -A	975,121	16,353,383	19,470,096	135,766	417,691	99.43%
WT-521-polyA ⁺ -B	1,486,571	14,289,978	16,556,643	235,511	383,019	99.41%
WT-521-polyA ⁺ -C	1,159,511	15,214,213	17,288,643	183,229	388,125	99.42%
WT-521-Total-A	43,675	2,733,682	2,000,708	2,601	57,008	99.40%
WT-521-Total-B	95,031	4,191,206	3,057,072	13,415	88,587	99.40%
WT-521-Total-C	108,356	5,332,347	4,010,920	11,245	118,546	99.37%
Total	3,868,265	58,114,809	62,384,082	581,767	1,452,976	99.41%

7.11. Análisis de calidad de los datos y expresión diferencial

Una vez obtenida las tablas de conteos y cargada dentro del sitio web de IDEAMEX, el análisis de los datos de entrada referente a librerías de las mutantes ter1 muestra que para los conteos normalizados con el método TMM (trimmed mean of M-values, Robinson & Oshlack (2010), las cuentas de los transcritos se encuentran distribuidas principalmente en el rango de 50 a 1,000 conteos con la mediana localizada alrededor de los 500 conteos y con valores por encima de las 2,000 cuentas en el extremo superior (Figura 19A), entre tanto en las librerías de la fracción nuclear poliadenilada, aproximadamente el 50% de los transcritos presentaron conteos cercanos a cero, con un ligero incremento en el rango inferior y decremento en el rango superior en las muestras de la fracción total (Figura 19B). Mientras en los gráficos de CPM (counts per million) en todas las muestras de las primeras librerías, más de 5,000 de los 6,783 transcritos de referencia que representan al menos el 73% de transcritos, tiene valores superiores a 10 cuentas y en las muestras de las mutantes ter1 respecto a la cepa parental se observa una ligera disminución en el número de transcritos con cero cuentas y sutiles incrementos en el número de transcritos con conteos superiores a 10 (Figura 19C).

Para las muestras de la fracción total resulta que aproximadamente el 75% de los transcritos tienen cuentas con valores de cero y aproximadamente el 16% de los transcritos totales tienen valores superiores a 10 cuentas, en tanto este valor se mantiene similar en las muestras de la fracción poliadenilada, el número de transcritos con cero cuentas disminuye ligeramente al mismo tiempo que se producen ligeros incrementos en el número de transcritos con conteos entre 1 y 2 (Figura 19D).

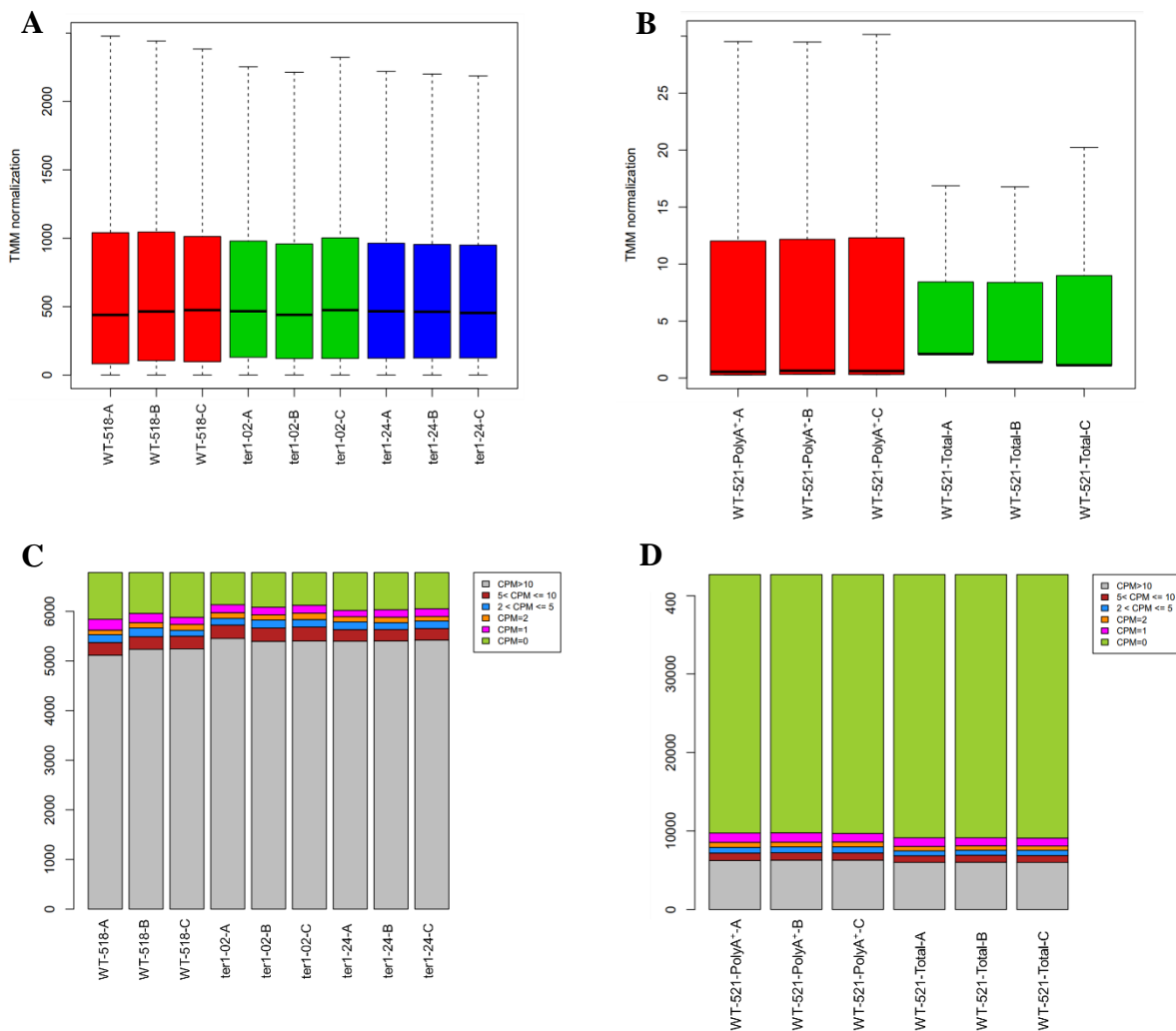


Figura 19. Distribución de las cuentas normalizadas (TMM y CPM) de las librerías de RNA-seq de la cepa 518, mutantes *ter1::hph* y de la fracción nuclear de la cepa 521 de *U. maydis*.

(A y B) Diagrama de cajas de las réplicas de la cepa parental y mutantes *ter1*, y réplicas de las fracciones nucleares respectivamente. (C y D) Grafico de CPM de las réplicas de la cepa parental y mutantes *ter1*, y réplicas de las fracciones nucleares respectivamente.

Finalmente, en la Figura 20 que corresponde a los gráficos de escalamiento multidimensional (MDS, multidimensional scaling) se observa que las réplicas de las respectivas muestras se encuentran agrupadas y separadas de las otras condiciones, indicando que en efecto las observaciones a continuación mostradas de genes expresados diferencialmente (DEGs, por sus siglas en inglés) son atribuibles a variaciones biológicas entre las muestras.

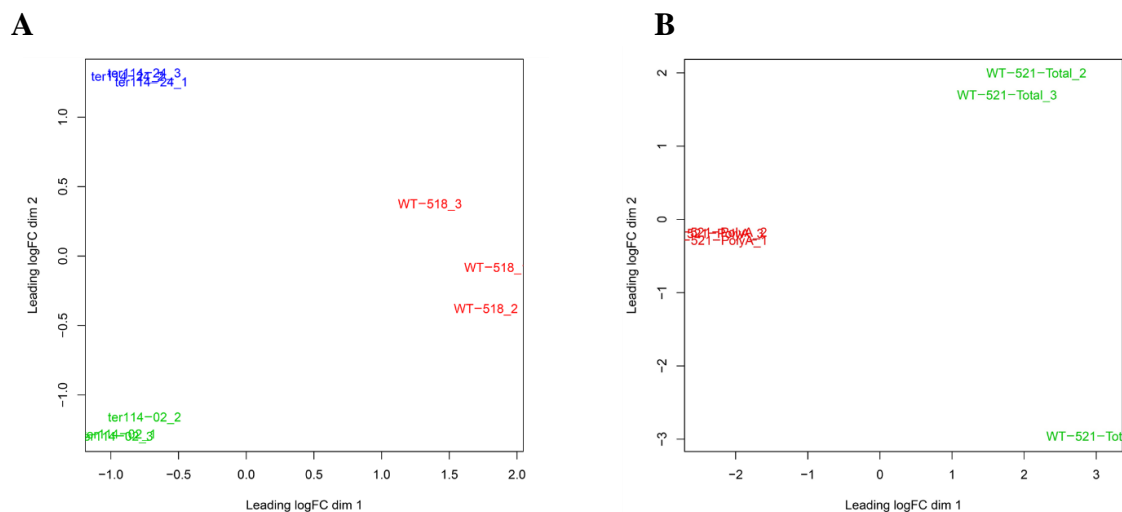


Figura 20. Gráficas MDS de las librerías de RNA-seq de la cepa 518, mutantes *ter1::hph* y de la fracción nuclear de la cepa 521 de *U. maydis*.

(A) Gráfica MDS de las réplicas de la cepa silvestre y mutantes *ter1*. (B) Gráfica MDS de las réplicas de la muestra de transcritos poliadenilados y muestra de transcritos totales de la fracción nuclear.

Finalmente, para el ensamble número uno de los métodos empleados DESeq2, NOISeq, Limma-Voom y EdgeR, solo se consideró como genes diferencialmente expresados a aquellos que además de tener valores de $\logFC \geq 2$ y $FDR \leq 0.01$, se encontraron reportados en los cuatro métodos, valores que corresponden a las intersecciones mostradas en los diagramas de Venn (Figura 21, panel derecho). Como se observa en los gráficos de volcán (Figura 21, panel izquierdo) para el análisis de la mutante *ter1-02* con excepción de dos genes la distribución de los DEGs se localiza exclusivamente en la región de genes sobre-expresados, con un total de 241 genes sobre-expresados identificados en común entre los cuatro métodos empleados, para el análisis de la mutante *ter1-24* se identificaron 276 DEGs, de los cuales 246 corresponden a genes sobre-expresados y 30 a genes sub-expresados, finalmente en el análisis de la mutante *ter1-24* respecto a *ter1-02* se detectó un total de 211 DEGs, de este número, 70 pertenecen a genes sobre-expresados y 141 genes sub-expresados.

Por otro lado, para las muestras del ensamble número dos se emplearon las mismas consideraciones que en el análisis anterior, obteniendo un total de 289 DEGs (Figura 22A), 201 de los cuales son genes sobre-expresados y 88 genes sub-expresados.

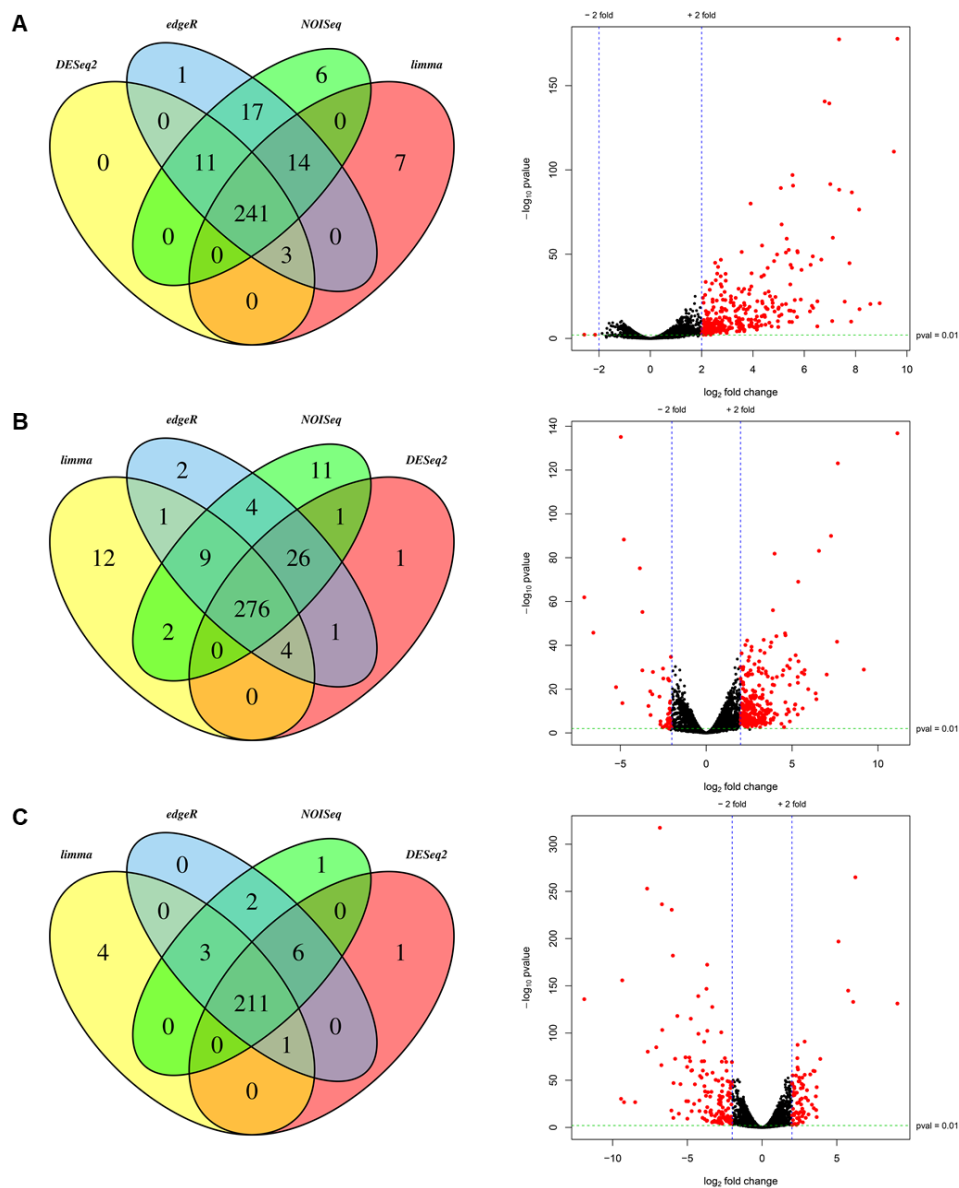


Figura 21. Diagramas de Venn y distribución de los DEGs de células haploides de *U. maydis* de la cepa silvestre 518 y mutantes *ter1::hph*.

Los diagramas de Venn muestran el número de DEGs e intersecciones entra cada método empleado. Los gráficos de volcán construidos con los valores de logFC obtenidos con EdgeR representan la distribución de DEGs (puntos rojos) de acuerdo con los valores de corte seleccionados. (A) Análisis de expresión diferencial entre la cepa WT 518 y mutante *ter1-02*. (B) Análisis de expresión diferencial entre la cepa WT 518 y mutante *ter1-24*. (C) Análisis de expresión diferencial entre las mutantes *ter1-02* y *ter1-24*.

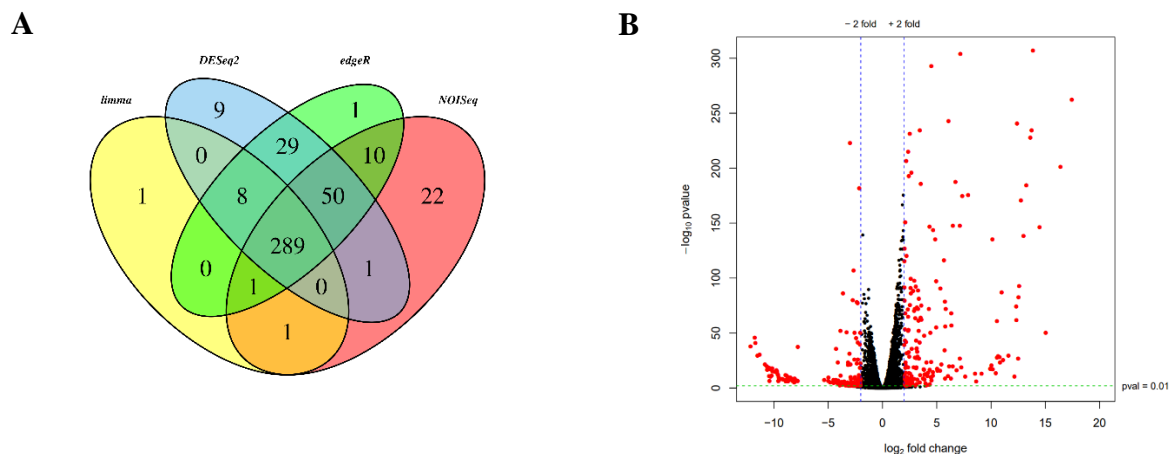


Figura 22. Diagramas de Venn y distribución de DEGs identificados entre los transcriptomas de la fracción nuclear poliadenilada y la fracción nuclear total de la cepa silvestre 521 de *U. maydis*.

(A) Representación del número de DEGs e intersecciones entra cada método empleado. (B) Distribución de DEGs (puntos rojos) de acuerdo con los valores de corte seleccionados. El grafico fue construido con los valores de logFC obtenidos con EdgeR.

7.12. Análisis de los transcritos reconstruidos de *ter1* de la fracción nuclear

A fin de obtener información acerca de la transcripción y maduración de TER, los transcritos reconstruidos de la fracción nuclear que mapearon sobre la región de *ter1* fueron analizados en conjunto con todos los transcritos de esta región depositados en las bases de datos, como resultado de nuestro ensamble se reconstruyeron cuatro transcritos que corresponden a isoformas de un único gen, sorprendentemente se observó que estos transcritos se originan en la posición -122 del sitio de inicio de la traducción del marco de lectura adyacente al extremo 5' de *ter1* (*UMAG_03169*, posición absoluta dentro del cromosoma: 125,222–126,080 nt) y finalizan en la posición + 1,948 respecto a la isoforma A. De acuerdo con la anotación de genoma del hongo este marco de lectura codifica para una proteína de función desconocida y presenta 2 isoformas (Figura 23A), la isoforma A (KIS68597, número de acceso XP_011389625.1) conformada por un solo exón largo de 405 pb que codifica para una proteína de 134 residuos de aminoácidos y la isoforma B (KIS68596, número de acceso XP_011389624.1) que contiene 2 exones de 241 pb y 188 pb separados por un intrón de 430 pb, la isoforma de esta proteína se compone de 142 residuos de aminoácidos donde los primeros 80 residuos son compartidos con la isoforma A.

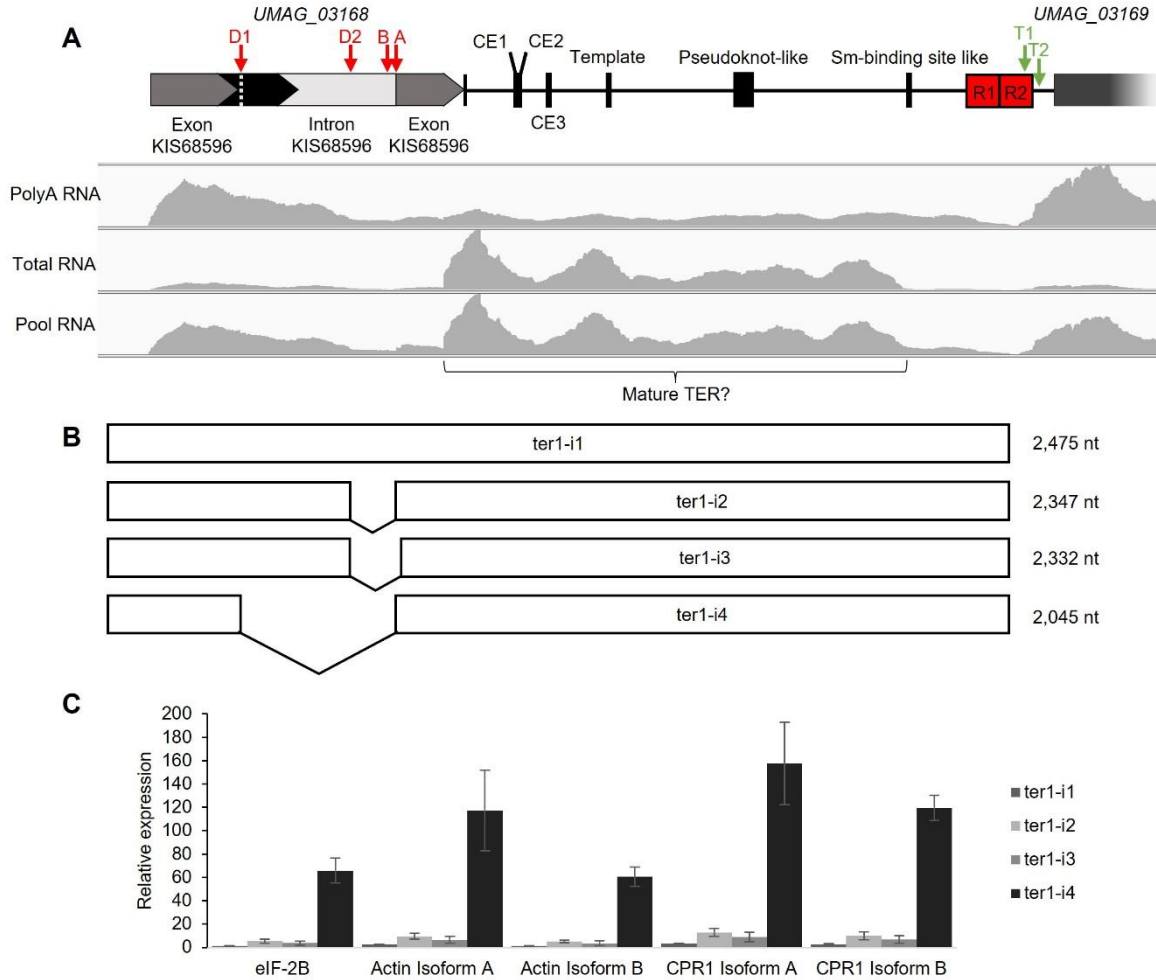


Figura 23. Análisis estructural y funcional de las lecturas de RNA-seq del locus *ter1* de *U. maydis*.

(A) Contexto genómico del locus *ter1* (panel superior) y densidad de lecturas de RNA-seq mapeadas (panel inferior). (B) Transcritos reconstruidos del locus *ter1* (rectángulos blancos) originados río arriba de *UMAG_03168*. (C) Análisis de expresión relativa de las isoformas de *ter1*. Los análisis fueron realizados con las cuentas normalizadas obtenidas con EdgeR.

De los transcritos reconstruidos la primera isoforma denominada *ter1-i1*, corresponde a un transcrito continuo de 2,475 nt (125,100–127,574) que no presenta diferencias significativas en la expresión entre la fracción poliadenilada y la fracción total (Tabla 2). La segunda isoforma, *ter1-i2* presenta una longitud de 2,347 nt, conformada por dos exones empalmados, el primero abarcando de la posición 125,100 a 125,764, mientras el segundo de la posición 125,893 a 127,574.

En este transcrito se observa el uso del sitio donador alternativo no canónico (D2) TTTCCCCAATgtgagcacca que corresponde a un motivo conservado entre Ustilaginales localizado en la posición 125,761–125,770, mientras el sitio de ramificación AGCTCACCG (125,863–125,871) y el sitio aceptor AG (125,891–125,892) son los mismos empleados para el procesamiento de KIS68596 (Figuras 23A y 23B). La tercera isoforma reconstruida ter1-i3 es un transcrito de 2,332 nt formado por dos exones, de los cuales el primero tiene una longitud de 664 nt y corresponde al mismo exón presente en ter1-i2, mientras que para empalme del segundo exón de 1,666 nt (125,908–127,574) emplea un sitio aceptor alternativo localizado 13 nt río abajo de ter1-i2. Ambas isoformas procesadas presentan un incremento significativo en su abundancia en la fracción total respecto a la fracción poliadenilada con valores de logFC alrededor de 3 y 2.4 respectivamente (Tabla 9). Por último, la isoforma ter1-i4, presenta una longitud de 2,045 nt, compuesta por dos exones de 363 nt (125,100–125,462) y 1,682 nt (125,893–127,574), y un intrón largo escindido de 430 nt (125,463–125,892); que emplea el mismo sitio donador (D1), sitio de ramificación (B) y sitio aceptor usados para el procesamiento de KIS68596, de los cuales los dos primeros corresponden a secuencias conservadas en Ustilaginales (Figuras A2A y A2B), además de mostrar un notable incremento en su expresión en la fracción total con un logFC \approx 6.5 (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de expresión diferencial de las isoformas de *ter1* reconstruidas de la cepa 521 de *U. maydis*.

Transcrito	PolyA RNA vs. Total RNA								
	Longitud	DESeq2 logFC	padj	EdgeR logFC	FDR	NOISeq logFC	prob	Limma-Voom logFC	padj
ter1-i1	2,475 nt	1.11	2.04E-17	1.10	3.63E-14	1.08	1.00E+00	1.10	5.61E-04
ter1-i2	2,347 nt	2.99	6.29E-93	2.99	1.11E-70	2.96	1.00E+00	3.00	1.64E-05
ter1-i3	2,332 nt	2.45	9.42E-11	2.45	1.75E-13	2.42	1.00E+00	2.31	1.05E-03
ter1-i4	2,045 nt	6.62	0.00E+00	6.62	0.00E+00	6.59	1.00E+00	6.61	5.09E-07

Por otro lado el hecho de que estas isoformas reconstruidas compartan el mismo sitio de inicio de la transcripción del gen de función desconocida *UMAG_03168* en conjunto con un notable incremento en el mapeo de las lecturas de una región de aproximadamente 1,280 nt que incluye a los elementos CE1 y CE2 (Figura 23A) sugieren que estas regiones corresponden a dominios estructurales de TER y que en efecto alguno de estos transcritos

corresponde al precursor de la forma madura de TER, mientras que la reconstrucción de estas isoformas continuas que posiblemente incluyen la versión funcional de TER no poliadenilada es causa de la existencia de ambas versiones poliadenilada y no poliadenilada como ocurre en TLC1 (Chapon et al., 1997), que finalmente coincide con los patrones de intrones estables escindidos de mRNAs (Yang et al., 2011). Finalmente, la posible relevancia de *ter1-i4* que podría corresponder al precursor de TER es resaltada por el notable incremento en su expresión relativa respecto a la expresión de varios genes de mantenimiento (Figura 23C).

7.13. Análisis transcripcional de las mutantes *ter1*

A fin de conocer las alteraciones en la expresión de genes a causa de la ausencia de *ter1* y su contribución al fenotipo observado, los transcritos diferencialmente expresados obtenidos previamente fueron anotados y clasificados, los resultados obtenidos son presentados en el Anexo B como *draft* para su publicación.

8. DISCUSIÓN

8.1. Identificación del gen *ter1*

En este trabajo se identificó la región que contiene al gen *ter1* en especies del orden de los Ustilaginales, haciendo uso del conocimiento previo de la secuencia telomérica en *U. maydis* (Guzmán & Sánchez, 1994) y de que hasta la fecha *ter1* es de copia única en todos los organismos examinados, la estrategia informática empleada en este trabajo previamente ha demostrado resultados satisfactorios para este fin en otros modelos, limitado solamente por la disponibilidad de genomas secuenciados del grupo de interés que permite discriminar entre posibles regiones candidatas (Chakrabarti et al., 2007), en contraste al enfoque molecular que aunque conduce a resultados efectivos, dada la naturaleza y baja abundancia del transcrito esta estrategia requiere de métodos más complejos y costosos (Leonardi et al., 2008; Webb & Zakian, 2008). Por cuestiones de enfoque y alta heterogeneidad en secuencias y longitud, en este trabajo no se abordó la propuesta de una estructura secundaria global correspondiente a este transcrito, sin embargo, como se demuestra en el apartado de resultados, dentro de *ter1* además del dominio templete conservado a lo largo de todo el grupo taxonómico, también fue posible identificar otras regiones conservadas que resultan críticas para la maduración y actividad de Ter1, que incluyen: el dominio pseudonudo, una estructura de hélice análoga a P6.1 y la secuencia AAU₅₋₆CY propuesta como el sitio de unión putativo para el complejo Sm7, el cual es requerido para la estabilidad y procesamiento de TLC1 (Leonardi et al., 2008; Seto et al., 1999). En tanto la ausencia de sitios de *splicing* y nula presencia de secuencias consenso río abajo del sitio Sm7-like sugiere que cerca de esta región se localiza el extremo final de *ter1* y por lo tanto no emplea la maquinaria de *splicing* para el procesamiento del extremo 3' como ocurre en otras levaduras y hongos (Box et al., 2008; Gunisova et al., 2009; Kuprys et al., 2013), en contraste, como se discute más adelante los resultados demostraron la ocurrencia de un procesamiento postranscripcional en el extremo 5' sin antecedentes previos para este tipo de gen en particular.

Por otra parte, aunque resta determinar la posición exacta del extremo 5' en el transcrito maduro para establecer su longitud final, el MSA demuestran una amplia variabilidad en el posible tamaño de Ter1 entre especies de Ustilaginales, esta divergencia se resalta con la identificación en *U. xerochloae* de una región con el potencial de transcribir un producto maduro con una longitud ampliamente contrastante a los otros miembros de Ustilaginales, de una longitud estimada no menor a los 556 nt, mientras en *Pseudozyma flocculosa* este mismo transcrito tiene una longitud mínima estimada de 1,958 nt (Tabla A1). En el primer caso la diferencia de tamaño estaría relacionado a la posibilidad de que esta especie preserva la forma más ancestral de *ter1* y en consecuencia más cercana al antecesor en común en este linaje, conteniendo solamente los elementos mínimos requeridos para el ensamble y activación del complejo, cuyo tamaño se asemeja a la versión reducida de TLC1 capaz de reconstruir la actividad del complejo *in vitro* (Zappulla et al., 2005). Además el incremento en la longitud de las regiones intergénicas en los otros miembros estaría relacionada con eventos de acumulación y dispersión de secuencias que podrían corresponder a regiones dispensables (Livengood et al., 2002; Zappulla et al., 2005), por lo tanto esta amplia divergencia en secuencia y longitud dentro de este grupo taxonómico es congruente con la noción de que TER funciona como un sitio de andamiaje altamente flexible (Zappulla & Cech, 2004). Interesantemente *U. maydis* presenta una versión truncada del dominio templete con una longitud de 9 nt a diferencia de las demás especies que contienen una longitud de 11 nt, quedando pendiente por demostrar si en estos organismos estas bases adicionales en el extremo 5' también son empleadas para la retrotranscripción y si existen diferencias en la procesividad del complejo en este organismo.

8.2. Caracterización del transcrito *ter1*

La actividad transcripcional del *locus ter1* en primer lugar fue apoyada por los hallazgos de ESTs depositados en la base de datos (números de acceso: JK215994, JK215995, y JK842063), y posteriormente corroborada mediante ensayos de RT-PCR como se muestra más adelante, adicionalmente el hecho de la identificación de actividad transcripcional detectada por estos autores a través del ciclo de vida del hongo en conjunto con cambios en la expresión de *UMAG_03168* (Lanver et al., 2018) refuerza la hipótesis inicial del requerimiento de Ter1 durante la transición dimórfica.

Mientras en este trabajo se logró la identificación de al menos cuatro isoformas de *ter1* que se transcriben a partir de *UMAG_03168*, los resultados de los dos transcritos reconstruidos por Donaldson et al. (2017) que difieren ligeramente en la longitud del extremo 3', en conjunto con la presencia de sitios alternativos de *splicing* apuntan a la existencia de isoformas alternativas y mecanismos de procesamiento más complejos, quedando pendiente por ser explorado la regulación y función de cada una de estas isoformas. Mientras en levadura, las fracciones poliadeniladas y no poliadeniladas maduras de TLC1 se procesan por vías separadas (Chapon et al., 1997; Noel et al., 2012), la ausencia dentro del genoma de *U. maydis* de homólogos a Nrd1 y Nab3 implicados en la terminación de la transcripción de la fracción no poliadenilada (Vasianovich & Wellinger, 2017) en conjunto con los resultados del análisis de expresión diferencial entre la fracción poliadenilada y no poliadenilada dejan abierta la posibilidad de que la versión madura de Ter1 podría derivarse de la isoforma poliadenilada policistrónica *ter1-i1*, representada por una región de lecturas apiladas de aproximadamente 1,280 nt, similar al transcrito observado por Chen et al. (1,291 nt, comunicación personal, número de acceso ON015423), y que coincide en el extremo con la posición del sitio de unión putativo del complejo Sm7. Por otra parte la presencia de ortólogos de las proteínas del complejo Sm7, dentro del genoma fúngico (*UMAG_10381*, *UMAG_04781*, *UMAG_11043*, *UMAG_12244*, *UMAG_10312*, *UMAG_12130* y *UMAG_10805*) y los genes hipotéticos homólogos a Mex67 y Mtr10 involucrados en la biogénesis de TLC1 en levadura que fueron encontrados dentro del genoma de *U. maydis* (*UMAG_01688* y *UMAG_01670*, respectivamente), sugieren un papel funcional del complejo Sm7 en la maduración de la subunidad Ter1 de la telomerasa de *U. maydis*, al igual que ocurre en la levadura (Chaves-Arquero et al., 2022; Seto et al., 1999).

8.3. Interrupción de *ter1* en la cepa 518 de *U. maydis*.

Al igual que ocurre en otras mutantes telomerasa negativas (Bautista-Espana et al., 2014; Lendvay et al., 1996) la interrupción del *locus ter1* provoca un fenotipo senescente, acortamiento de los telómeros y cambios en la morfología colonial, interesantemente las mutantes *ter1* además exhiben anormalidades adicionales como incremento en la presencia de células uninucleadas elongadas, alteraciones en el crecimiento polar y ángulo de gemación en mayores porcentajes que las mutantes *trt1*, como resultado alteraciones en la segregación y tamaño de los cromosomas (Posadas-Gutiérrez, 2020) que se encuentra relacionada con

defectos en la función de los telómeros como ha sido reportado en otros organismos (Gisselsson et al., 2001; Hande et al., 1999; McClintock, 1941). En contraparte a los ensayos de infección con cruces heterocigotas *trf*⁻ las cruces heterocigotas *ter*⁻ resultaron incapaces de desarrollar tumores lo que incluso resulta altamente contrastante a las cruces *trf*/*trf*⁺ que a pesar de presentar un decremento en la aparición de síntomas y formación de tumores son capaces de completar el ciclo de vida desarrollando teliosporas, aunque en menor abundancia (Bautista-Espana et al., 2014), en primera instancia en ambos casos los defectos en la competencia para completar el ciclo de vida podrían estar asociados a fallas en el mantenimiento de los telómeros que resulta congruente con estudios que ponen de manifiesto el papel de la longitud de los telómeros en la fertilidad y embriogénesis en eucariotas superiores (Kalmbach et al., 2013; Keefe et al., 2005), mientras que las diferencias morfológicas entre las mutantes de ambos componentes en conjunto con los resultados de los ensayos de infección ponen de manifiesto diferentes contribuciones de cada componente a lo largo del ciclo de vida. En otros organismos se ha demostrado que la actividad de TERT no se encuentra limitada al alargamiento de los telómeros y participa en otros procesos que incluyen: la regulación de la expresión de genes, respuesta al daño del ADN, proliferación celular y metabolismo mitocondrial (Campelo et al., 2015; Haendeler et al., 2009; Imamura et al., 2008; Park et al., 2009), mientras que para TER se ha demostrado que este participa en la respuesta al daño del ADN y que es capaz de desempeñar una función antiapoptótica promoviendo la autofagia, contribuyendo a la protección celular (Romaniuk et al., 2019; Rubtsova et al., 2018). Para comprender estas diferencias se realizó el análisis de los datos de RNA-seq como se detalla en el Anexo B, la abolición de la función de TER desencadena la alteración de genes involucrados en la vías de ALT y DDR, y genes proximales a telómeros, que resulta congruente con los patrones observados en células supervivientes (Beletsky et al., 2017; Nautiyal et al., 2002; Teng et al., 2002), interesantemente los resultados, en las mutantes, que explican la falla para completar el ciclo de vida están asociados a la alteración de factores de transcripción y *clusters* de genes implicados en el control del ciclo de vida y transición dimórfica, como previamente se ha reportado algunos de estos factores de transcripción regulan la expresión de *clusters* de genes de virulencia (Kamper et al., 2006).

La que la erosión de los telómeros y pérdida del TPE provee una explicación acerca de los cambios en la expresión de *clusters* regulados por factores de transcripción próximos a telómeros (Baur et al., 2001; Gottschling et al., 1990) que resulta en el desencadenamiento de la expresión de sus genes diana.

Respecto a la alteración de factores de transcripción alejados de la región subtelomérica como el regulador maestro Rbf1, independientemente de su regulación medida por el heterodímero b, su regulación podría estar asociada a un papel regulatorio mediado por la transcripción de *ter1* a través del remodelamiento de la cromatina de la región, interferencia en la unión de factores de transcripción o regulación de transcritos antisentido, como previamente se ha descrito en otros lncRNAs, donde es en sí la dirección y transcripción del gen de lncRNA el que promueve la función regulatoria y en contraparte la secuencia nucleotídica resulta ampliamente dispensable (Martens et al., 2004; Wang & Chang, 2011). Conjuntamente al desarrollo de este trabajo se reportó que la fracción proteica codificada por el precursor *UMAG_03168* se encuentra relacionada a una proteína con un papel en la progresión de la meiosis (Logeswaran et al., 2022), lo que refuerza esta primera posibilidad de una regulación indirecta del ciclo de vida mediada por la transcripción. Por otra parte, una segunda posibilidad más interesante resultaría en la capacidad de Ter1 de asociarse a algún factor de transcripción como se ha observado en otros organismos, aunque ambos casos son posibles no se debe dejar de considerar y no resultaría extraño que Ter1 sea capaz de poseer más de un mecanismo regulatorio ya que estos no son mutuamente excluyentes (Wang & Chang, 2011). Es necesario comparar los resultados aquí obtenidos con el transcriptoma de las mutantes *trt1* y emplear estrategias alternativas para la abolición de la función de la telomerasa, como lo son mutaciones en los sitios de unión entre los componentes que resultan efectivos para impedir la formación del complejo sin alterar las posibles funciones extra-teloméricas de los componentes.

9. CONCLUSIONES

Se identificó el gen que codifica para la subunidad TER en *U. maydis*, que al igual que en otros organismos contiene los elementos estructurales mínimos requeridos para su actividad, y del mismo modo su interrupción provoca el acortamiento gradual de los telómeros, incremento en el tiempo de generación, disminución del potencial replicativo y eventualmente el surgimiento de células supervivientes telomerasa negativas que presentan rearrreglos en el patrón de hibridación del TRF y cambios en la expresión de genes involucrados en las vías de DDR y ALT.

Adicionalmente, la carencia de este componente desencadena la alteración en la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, diferenciación celular y de un conjunto de genes requeridos para la invasión de los tejidos de la planta hospedera y evasión de la respuesta inmune, lo que conduce a la formación de aberraciones cromosómicas, alteraciones morfológicas e incapacidad para completar el ciclo de vida.

Las diferencias morfológicas presentes entre las mutantes *ter1* están asociadas parcialmente a cambios únicos en los patrones de expresión de genes localizados en el extremo cromosomal como resultado del acortamiento de los telómeros y pérdida de la regulación mediada por el TPE, mientras que el decaimiento de la virulencia e incapacidad para completar el ciclo de vida se encuentra relacionado con la alteración en la expresión de componentes río arriba de la cascada de regulación implicada en la morfogénesis del hongo en particular *rbf1* y sus genes diana.

Se sugiere la identificación de una novedosa vía de procesamiento de la subunidad TER a partir de un gen codificante (*UMAG_03168*) que, en conjunto con la preservación de los dominios esenciales de TER dentro de un gen ampliamente divergente en longitud y secuencia, posicionan a *U. maydis* como un modelo prometedor para estudios de la función y evolución de los dominios que componen la subunidad, sus vías de transcripción y maduración.

10. PERSPECTIVAS.

Realizar el ensamblaje y análisis del transcriptoma de las mutantes *trt1* para compararlo con los resultados del análisis de expresión diferencial obtenido en este trabajo, con el objetivo de obtener más información sobre las posibles funciones extra-teloméricas específicas de cada componente central de la telomerasa y su contribución al desarrollo del ciclo de vida.

Implementar una serie de mutaciones puntuales dentro de los sitios de procesamiento de *UMAG_03168* con el propósito de determinar su impacto en la transcripción y procesamiento de las diversas isoformas y en la consecuente abundancia del transcrito maduro de Ter1.

Implementar una serie de mutaciones puntuales dentro de *ter1* a fin de impedir el ensamble del complejo RNP sin provocar cambios en la arquitectura de la región que pudieran provocar alteración en la expresión de los genes adyacentes. Con la finalidad de asociar o descartar los cambios en el patrón de expresión como resultado del acortamiento de los telómeros o como consecuencia de una posible función regulatoria de Ter1.

Realizar la delección del *ter1* en especies alternativas de Ustilaginales que contengan la maquinaria de RNAi, para explorar las posibles vías de procesamiento y funciones extra-teloméricas de este componente en organismos dimórficos.

11. REFERENCIAS

- Abad, J. P., De Pablos, B., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Martin-Gallardo, A., & Villasante, A. (2004). TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Mol Biol Evol*, *21*(9), 1620-1624. doi:10.1093/molbev/msh180
- Alcaraz-Perez, F., Garcia-Castillo, J., Garcia-Moreno, D., Lopez-Munoz, A., Anchelín, M., Angosto, D., . . . Cayuela, M. L. (2014). A non-canonical function of telomerase RNA in the regulation of developmental myelopoiesis in zebrafish. *Nat Commun*, *5*, 3228. doi:10.1038/ncomms4228
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., . . . Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(21), 10114-10118.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, *215*(3), 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Arkhipova, I. R., Pyatkov, K. I., Meselson, M., & Evgen'ev, M. B. (2003). Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. *Nat Genet*, *33*(2), 123-124. doi:10.1038/ng1074
- Autexier, C., & Greider, C. W. (1995). Boundary elements of the *Tetrahymena* telomerase RNA template and alignment domains. *Genes Dev*, *9*(18), 2227-2239. doi:10.1101/gad.9.18.2227
- Azzalin, C. M., & Lingner, J. (2015). Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends Cell Biol*, *25*(1), 29-36. doi:10.1016/j.tcb.2014.08.007
- Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriantseva, L., Giulotto, E., & Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, *318*(5851), 798-801. doi:10.1126/science.1147182
- Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet*, *29*, 179-208. doi:10.1146/annurev.ge.29.120195.001143
- Barry, J. D., Ginger, M. L., Burton, P., & McCulloch, R. (2003). Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int J Parasitol*, *33*(1), 29-45. doi:10.1016/s0020-7519(02)00247-3
- Baur, J. A., Zou, Y., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science*, *292*(5524), 2075-2077. doi:10.1126/science.1062329
- Bautista-Espana, D., Anastacio-Marcelino, E., Horta-Valerdi, G., Celestino-Montes, A., Kojic, M., Negrete-Abascal, E., . . . Sanchez-Alonso, P. (2014). The telomerase reverse transcriptase subunit from the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *PLoS One*, *9*(10), e109981. doi:10.1371/journal.pone.0109981
- Beletsky, A. V., Malyavko, A. N., Sukhanova, M. V., Mardanova, E. S., Zvereva, M. I., Petrova, O. A., . . . Ravin, N. V. (2017). The genome-wide transcription response to telomerase deficiency in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *BMC Genomics*, *18*(1), 492. doi:10.1186/s12864-017-3889-x
- Berger, S. L., & Kimmel, A. R. (1987). *Guide to molecular cloning techniques*. Orlando: Academic Press.

- Blackburn, E. H. (1992). Telomerases. *Annu Rev Biochem*, 61, 113-129. doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.000553
- Blackburn, E. H. (1994). Telomeres: no end in sight. *Cell*, 77(5), 621-623. doi:10.1016/0092-8674(94)90046-9
- Blackburn, E. H. (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*, 579(4), 859-862. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.036
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., . . . Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-352. doi:10.1126/science.279.5349.349
- Boehringer, M. (1989). DNA Labelling and Detection Nonradioactive: Applications Manual.
- Bolker, M. (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology (Reading)*, 147(Pt 6), 1395-1401. doi:10.1099/00221287-147-6-1395
- Bolker, M., Genin, S., Lehmler, C., & Kahmann, R. (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 320-325. doi:10.1139/b95-262
- Bottin, A., Kamper, J., & Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, 253(3), 342-352. doi:10.1007/pl00008601
- Box, J. A., Bunch, J. T., Tang, W., & Baumann, P. (2008). Spliceosomal cleavage generates the 3' end of telomerase RNA. *Nature*, 456(7224), 910-914. doi:10.1038/nature07584
- Brachmann, A., Konig, J., Julius, C., & Feldbrugge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, 272(2), 216-226. doi:10.1007/s00438-004-1047-z
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., & Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, 42(4), 1047-1063. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02699.x
- Brown, C. A., Murray, A. W., & Verstrepen, K. J. (2010). Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Curr Biol*, 20(10), 895-903. doi:10.1016/j.cub.2010.04.027
- Brown, Y., Abraham, M., Pearl, S., Kabaha, M. M., Elboher, E., & Tzfati, Y. (2007). A critical three-way junction is conserved in budding yeast and vertebrate telomerase RNAs. *Nucleic Acids Res*, 35(18), 6280-6289. doi:10.1093/nar/gkm713
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., & Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, 3(11), 1271-1274. doi:10.1038/nm1197-1271
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., . . . Whited, J. L. (2017). A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep*, 18(3), 762-776. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.063
- Campelo, R., Diaz Lozano, I., Figarella, K., Osuna, A., & Ramirez, J. L. (2015). Leishmania major telomerase TERT protein has a nuclear/mitochondrial eclipsed distribution that is affected by oxidative stress. *Infect Immun*, 83(1), 57-66. doi:10.1128/IAI.02269-14

- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., . . . Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, *21*(13), 2933-2942. doi:10.1093/bioinformatics/bti473
- Chakrabarti, K., Pearson, M., Grate, L., Sterne-Weiler, T., Deans, J., Donohue, J. P., & Ares, M., Jr. (2007). Structural RNAs of known and unknown function identified in malaria parasites by comparative genomics and RNA analysis. *RNA*, *13*(11), 1923-1939. doi:10.1261/rna.751807
- Chan, C. S., & Tye, B. K. (1983). Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell*, *33*(2), 563-573. doi:10.1016/0092-8674(83)90437-3
- Chapon, C., Cech, T. R., & Zaug, A. J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA*, *3*(11), 1337-1351.
- Chaves-Arquero, B., Martinez-Lumbreras, S., Camero, S., Santiveri, C. M., Mirassou, Y., Campos-Olivas, R., . . . Perez-Canadillas, J. M. (2022). Structural basis of Nrd1-Nab3 heterodimerization. *Life Sci Alliance*, *5*(4). doi:10.26508/lsa.202101252
- Chen, J. J. L., & Podlevsky, J. D. (2016). Telomeres and Telomerase. In R. A. Bradshaw & P. D. Stahl (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology* (pp. 418-425). Waltham: Academic Press.
- Chen, J. L., Blasco, M. A., & Greider, C. W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, *100*(5), 503-514. doi:10.1016/s0092-8674(00)80687-x
- Chen, J. L., & Greider, C. W. (2005). Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(23), 8080-8085; discussion 8077-8089. doi:10.1073/pnas.0502259102
- Chen, J. L., Opperman, K. K., & Greider, C. W. (2002). A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Res*, *30*(2), 592-597. doi:10.1093/nar/30.2.592
- Chen, N. W. G., Thareau, V., Ribeiro, T., Magdelenat, G., Ashfield, T., Innes, R. W., . . . Geffroy, V. (2018). Common Bean Subtelomeres Are Hot Spots of Recombination and Favor Resistance Gene Evolution. *Front Plant Sci*, *9*, 1185. doi:10.3389/fpls.2018.01185
- Chen, Q., Ijima, A., & Greider, C. W. (2001). Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol*, *21*(5), 1819-1827. doi:10.1128/MCB.21.5.1819-1827.2001
- Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., & Reddel, R. R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, *315*(5820), 1850-1853. doi:10.1126/science.1138596
- Cristofari, G., Adolf, E., Reichenbach, P., Sikora, K., Terns, R. M., Terns, M. P., & Lingner, J. (2007). Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell*, *27*(6), 882-889. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.020
- Cross, S. H., Allshire, R. C., McKay, S. J., McGill, N. I., & Cooke, H. J. (1989). Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*, *338*(6218), 771-774. doi:10.1038/338771a0
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, *19*(18), 2100-2110. doi:10.1101/gad.1346005
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., . . . Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, *13*(4), 414-430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

- Donaldson, M. E., Ostrowski, L. A., Goulet, K. M., & Saville, B. J. (2017). Transcriptome analysis of smut fungi reveals widespread intergenic transcription and conserved antisense transcript expression. *BMC Genomics*, *18*(1), 340. doi:10.1186/s12864-017-3720-8
- Doyle, C. E., Donaldson, M. E., Morrison, E. N., & Saville, B. J. (2011). *Ustilago maydis* transcript features identified through full-length cDNA analysis. *Mol Genet Genomics*, *286*(2), 143-159. doi:10.1007/s00438-011-0634-z
- Egan, E. D., & Collins, K. (2012). Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. *RNA*, *18*(10), 1747-1759. doi:10.1261/rna.034629.112
- Fabre, E., Muller, H., Therizols, P., Lafontaine, I., Dujon, B., & Fairhead, C. (2005). Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Mol Biol Evol*, *22*(4), 856-873. doi:10.1093/molbev/msi070
- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*, *39*(Web Server issue), W29-37. doi:10.1093/nar/gkr367
- Fisher, T. S., & Zakian, V. A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)*, *4*(11), 1215-1226. doi:10.1016/j.dnarep.2005.04.021
- Friedman, K. L., & Cech, T. R. (1999). Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev*, *13*(21), 2863-2874. doi:10.1101/gad.13.21.2863
- Fu, D., & Collins, K. (2003). Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs. *Mol Cell*, *11*(5), 1361-1372. doi:10.1016/s1097-2765(03)00196-5
- Gao, W., Khang, C. H., Park, S. Y., Lee, Y. H., & Kang, S. (2002). Evolution and organization of a highly dynamic, subtelomeric helicase gene family in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genetics*, *162*(1), 103-112. doi:10.1093/genetics/162.1.103
- Gilley, D., & Blackburn, E. H. (1996). Specific RNA residue interactions required for enzymatic functions of Tetrahymena telomerase. *Mol Cell Biol*, *16*(1), 66-75. doi:10.1128/MCB.16.1.66
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bolker, M., & Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, *68*(4), 647-657. doi:10.1016/0092-8674(92)90141-x
- Gisselsson, D., Jonson, T., Petersen, A., Strombeck, B., Dal Cin, P., Hoglund, M., . . . Mandahl, N. (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(22), 12683-12688. doi:10.1073/pnas.211357798
- Gladyshev, E. A., & Arkhipova, I. R. (2007). Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(22), 9352-9357. doi:10.1073/pnas.0702741104
- Gold, S. E., Bakkeren, G., Davies, J. E., & Kronstad, J. W. (1994). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene*, *142*(2), 225-230. doi:10.1016/0378-1119(94)90265-8
- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., & Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, *63*(4), 751-762. doi:10.1016/0092-8674(90)90141-z

- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., . . . Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, *29*(7), 644-652. doi:10.1038/nbt.1883
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, *51*(6), 887-898. doi:10.1016/0092-8674(87)90576-9
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, *337*(6205), 331-337. doi:10.1038/337331a0
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, *97*(4), 503-514. doi:10.1016/s0092-8674(00)80760-6
- Gunisova, S., Elboher, E., Nosek, J., Gorkovoy, V., Brown, Y., Lucier, J. F., . . . Tomaska, L. (2009). Identification and comparative analysis of telomerase RNAs from *Candida* species reveal conservation of functional elements. *RNA*, *15*(4), 546-559. doi:10.1261/rna.1194009
- Guzman, P. A., & Sanchez, J. G. (1994). Characterization of telomeric regions from *Ustilago maydis*. *Microbiology (Reading)*, *140* (Pt 3), 551-557. doi:10.1099/00221287-140-3-551
- Haendeler, J., Drose, S., Buchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., . . . Dimmeler, S. (2009). Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(6), 929-935. doi:10.1161/ATVBAHA.109.185546
- Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P., & Blasco, M. A. (1999). Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol*, *144*(4), 589-601. doi:10.1083/jcb.144.4.589
- Hansen, K. R., Burns, G., Mata, J., Volpe, T. A., Martienssen, R. A., Bahler, J., & Thon, G. (2005). Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. *Mol Cell Biol*, *25*(2), 590-601. doi:10.1128/MCB.25.2.590-601.2005
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*, 585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., . . . Kamper, J. (2010). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog*, *6*(8), e1001035. doi:10.1371/journal.ppat.1001035
- Ho, E. C., Cahill, M. J., & Saville, B. J. (2007). Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC Genomics*, *8*, 334. doi:10.1186/1471-2164-8-334
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. In R. C. King (Ed.), *Handbook of Genetics* (Vol. 1, pp. 575-595). New York: Plenum Press.
- Holloman, W. K., Schirawski, J., & Holliday, R. (2008). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, *45* Suppl 1, S31-39.
- Huang, P., Pryde, F. E., Lester, D., Maddison, R. L., Borts, R. H., Hickson, I. D., & Louis, E. J. (2001). SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr Biol*, *11*(2), 125-129. doi:10.1016/s0960-9822(01)00021-5

- Imamura, S., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Hanai, J., Raftopoulou, C., Murphey, R. D., . . . Kishi, S. (2008). A non-canonical function of zebrafish telomerase reverse transcriptase is required for developmental hematopoiesis. *PLoS One*, *3*(10), e3364. doi:10.1371/journal.pone.0003364
- Jimenez-Jacinto, V., Sanchez-Flores, A., & Vega-Alvarado, L. (2019). Integrative Differential Expression Analysis for Multiple EXperiments (IDEAMEX): A Web Server Tool for Integrated RNA-Seq Data Analysis. *Front Genet*, *10*, 279. doi:10.3389/fgene.2019.00279
- Jose, S. S., Tidu, F., Burilova, P., Kepak, T., Bendickova, K., & Fric, J. (2018). The Telomerase Complex Directly Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Senescence in an Induced Pluripotent Stem Cell Model of Telomeropathy. *Front Genet*, *9*, 345. doi:10.3389/fgene.2018.00345
- Jurczyk, J., Nouwens, A. S., Holien, J. K., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Parker, M. W., . . . Bryan, T. M. (2011). Direct involvement of the TEN domain at the active site of human telomerase. *Nucleic Acids Res*, *39*(5), 1774-1788. doi:10.1093/nar/gkq1083
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M., & Kämper, J. (2000). Ustilago maydis, the Causative Agent of Corn Smut Disease. In J. W. Kronstad (Ed.), *Fungal Pathology* (pp. 347-371). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Kalmbach, K. H., Fontes Antunes, D. M., Dracxler, R. C., Knier, T. W., Seth-Smith, M. L., Wang, F., . . . Keefe, D. L. (2013). Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril*, *99*(1), 23-29. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.039
- Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., . . . Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature*, *444*(7115), 97-101. doi:10.1038/nature05248
- Kannan, R., Helston, R. M., Dannebaum, R. O., & Baumann, P. (2015). Diverse mechanisms for spliceosome-mediated 3' end processing of telomerase RNA. *Nat Commun*, *6*, 6104. doi:10.1038/ncomms7104
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*, *30*(14), 3059-3066. doi:10.1093/nar/gkf436
- Keefe, D. L., Franco, S., Liu, L., Trimarchi, J., Cao, B., Weitzen, S., . . . Blasco, M. A. (2005). Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women-toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol*, *192*(4), 1256-1260; discussion 1260-1251. doi:10.1016/j.ajog.2005.01.036
- Keon, J. P., White, G. A., & Hargreaves, J. A. (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, Ustilago maydis. *Curr Genet*, *19*(6), 475-481. doi:10.1007/BF00312739
- Kim, J. M., Vanguri, S., Boeke, J. D., Gabriel, A., & Voytas, D. F. (1998). Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete Saccharomyces cerevisiae genome sequence. *Genome Res*, *8*(5), 464-478. doi:10.1101/gr.8.5.464
- Kim, N. K., Theimer, C. A., Mitchell, J. R., Collins, K., & Feigon, J. (2010). Effect of pseudouridylation on the structure and activity of the catalytically essential P6.1 hairpin in human telomerase RNA. *Nucleic Acids Res*, *38*(19), 6746-6756. doi:10.1093/nar/gkq525

- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the fungi 10th edition*. Wallingford, Oxon, England: CABI.
- Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., & Jady, B. E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell*, *37*(5), 597-606. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.032
- Kojic, M., Kostrub, C. F., Buchman, A. R., & Holloman, W. K. (2002). BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell*, *10*(3), 683-691. doi:10.1016/s1097-2765(02)00632-9
- Kopylova, E., Noe, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, *28*(24), 3211-3217. doi:10.1093/bioinformatics/bts611
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, *305*(3), 567-580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Kronstad, J. W., & Leong, S. A. (1990). The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev*, *4*(8), 1384-1395. doi:10.1101/gad.4.8.1384
- Kuprys, P. V., Davis, S. M., Hauer, T. M., Meltser, M., Tzfati, Y., & Kirk, K. E. (2013). Identification of telomerase RNAs from filamentous fungi reveals conservation with vertebrates and yeasts. *PLoS One*, *8*(3), e58661. doi:10.1371/journal.pone.0058661
- Lai, C. K., Miller, M. C., & Collins, K. (2002). Template boundary definition in *Tetrahymena* telomerase. *Genes Dev*, *16*(4), 415-420. doi:10.1101/gad.962602
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, *9*(4), 357-359. doi:10.1038/nmeth.1923
- Lanver, D., Berndt, P., Tollot, M., Naik, V., Vranes, M., Warmann, T., . . . Kahmann, R. (2014). Plant surface cues prime *Ustilago maydis* for biotrophic development. *PLoS Pathog*, *10*(7), e1004272. doi:10.1371/journal.ppat.1004272
- Lanver, D., Muller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., . . . Kahmann, R. (2018). The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell*, *30*(2), 300-323. doi:10.1105/tpc.17.00764
- Lee, J. Y., Kozak, M., Martin, J. D., Pennock, E., & Johnson, F. B. (2007). Evidence that a RecQ helicase slows senescence by resolving recombining telomeres. *PLoS Biol*, *5*(6), e160. doi:10.1371/journal.pbio.0050160
- Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B., & Lundblad, V. (1996). Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, *144*(4), 1399-1412.
- León-Ramírez, C. G., Sánchez-Arreguin, J. A., & Ruiz-Herrera, J. (2014). *Ustilago maydis*, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. *Natural Resources*, *5*, 256-267.
- Leonardi, J., Box, J. A., Bunch, J. T., & Baumann, P. (2008). TER1, the RNA subunit of fission yeast telomerase. *Nat Struct Mol Biol*, *15*(1), 26-33. doi:10.1038/nsmb1343
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*, 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323
- Lingner, J., Hendrick, L. L., & Cech, T. R. (1994). Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev*, *8*(16), 1984-1998. doi:10.1101/gad.8.16.1984

- Livengood, A. J., Zaug, A. J., & Cech, T. R. (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol*, 22(7), 2366-2374. doi:10.1128/mcb.22.7.2366-2374.2002
- Logeswaran, D., Li, Y., Akhter, K., Podlevsky, J. D., Olson, T. L., Forsberg, K., & Chen, J. J. (2022). Biogenesis of telomerase RNA from a protein-coding mRNA precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(41), e2204636119. doi:10.1073/pnas.2204636119
- Louis, E. J., & Haber, J. E. (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 131(3), 559-574. doi:10.1093/genetics/131.3.559
- Louis, E. J., Naumova, E. S., Lee, A., Naumov, G., & Haber, J. E. (1994). The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics*, 136(3), 789-802. doi:10.1093/genetics/136.3.789
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15(12), 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- Lue, N. F. (2005). A physical and functional constituent of telomerase anchor site. *J Biol Chem*, 280(28), 26586-26591. doi:10.1074/jbc.M503028200
- Lue, N. F., Lin, Y. C., & Mian, I. S. (2003). A conserved telomerase motif within the catalytic domain of telomerase reverse transcriptase is specifically required for repeat addition processivity. *Mol Cell Biol*, 23(23), 8440-8449. doi:10.1128/MCB.23.23.8440-8449.2003
- Lundblad, V., & Blackburn, E. H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, 73(2), 347-360. doi:10.1016/0092-8674(93)90234-h
- Makovets, S., Williams, T. L., & Blackburn, E. H. (2008). The telotype defines the telomere state in *Saccharomyces cerevisiae* and is inherited as a dominant non-Mendelian characteristic in cells lacking telomerase. *Genetics*, 178(1), 245-257. doi:10.1534/genetics.107.083030
- Mandell, J. G., Goodrich, K. J., Bahler, J., & Cech, T. R. (2005). Expression of a RecQ helicase homolog affects progression through crisis in fission yeast lacking telomerase. *J Biol Chem*, 280(7), 5249-5257. doi:10.1074/jbc.M412756200
- Martens, J. A., Laprade, L., & Winston, F. (2004). Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature*, 429(6991), 571-574. doi:10.1038/nature02538
- Mason, D. X., Goneska, E., & Greider, C. W. (2003). Stem-loop IV of tetrahymena telomerase RNA stimulates processivity in trans. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5606-5613. doi:10.1128/MCB.23.16.5606-5613.2003
- Mason, J. M., & Biessmann, H. (1995). The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet*, 11(2), 58-62. doi:10.1016/s0168-9525(00)88998-2
- Masutomi, K., Kaneko, S., Hayashi, N., Yamashita, T., Shirota, Y., Kobayashi, K., & Murakami, S. (2000). Telomerase activity reconstituted in vitro with purified human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA component. *J Biol Chem*, 275(29), 22568-22573. doi:10.1074/jbc.M000622200
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics*, 26(2), 234-282.
- McCormick-Graham, M., & Romero, D. P. (1995). Ciliate telomerase RNA structural features. *Nucleic Acids Res*, 23(7), 1091-1097. doi:10.1093/nar/23.7.1091

- McEachern, M. J., & Blackburn, E. H. (1994). A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(8), 3453-3457. doi:10.1073/pnas.91.8.3453
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., . . . Weinberg, R. A. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, *90*(4), 785-795. doi:10.1016/s0092-8674(00)80538-3
- Moriarty, T. J., Marie-Egyptienne, D. T., & Autexier, C. (2004). Functional organization of repeat addition processivity and DNA synthesis determinants in the human telomerase multimer. *Mol Cell Biol*, *24*(9), 3720-3733. doi:10.1128/MCB.24.9.3720-3733.2004
- Morrison, E. N., Donaldson, M. E., & Saville, B. (2012). Identification and analysis of genes expressed in the *Ustilago maydis* dikaryon: uncovering a novel class of pathogenesis genes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *34*, 417 - 435.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., . . . Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(18), 6622-6626. doi:10.1073/pnas.85.18.6622
- Mozdy, A. D., & Cech, T. R. (2006). Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA*, *12*(9), 1721-1737. doi:10.1261/rna.134706
- Muller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M., & Kahmann, R. (2003). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell*, *2*(6), 1187-1199. doi:10.1128/EC.2.6.1187-1199.2003
- Munsterkotter, M., & Steinberg, G. (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, *8*, 473. doi:10.1186/1471-2164-8-473
- Nautiyal, S., DeRisi, J. L., & Blackburn, E. H. (2002). The genome-wide expression response to telomerase deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(14), 9316-9321. doi:10.1073/pnas.142162499
- Nelson, A. D., & Shippen, D. E. (2015). Evolution of TERT-interacting lncRNAs: expanding the regulatory landscape of telomerase. *Front Genet*, *6*, 277. doi:10.3389/fgene.2015.00277
- Noel, J. F., Larose, S., Abou Elela, S., & Wellinger, R. J. (2012). Budding yeast telomerase RNA transcription termination is dictated by the Nrd1/Nab3 non-coding RNA termination pathway. *Nucleic Acids Res*, *40*(12), 5625-5636. doi:10.1093/nar/gks200
- Nugent, K. G., Choffe, K., & Saville, B. J. (2004). Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genet Biol*, *41*(3), 349-360. doi:10.1016/j.fgb.2003.11.006
- O'Connor, C. M., Lai, C. K., & Collins, K. (2005). Two purified domains of telomerase reverse transcriptase reconstitute sequence-specific interactions with RNA. *J Biol Chem*, *280*(17), 17533-17539. doi:10.1074/jbc.M501211200
- Okmen, B., Mathow, D., Hof, A., Lahrmann, U., Assmann, D., & Doehlemann, G. (2018). Mining the effector repertoire of the biotrophic fungal pathogen *Ustilago hordei* during host and non-host infection. *Mol Plant Pathol*, *19*(12), 2603-2622. doi:10.1111/mpp.12732

- Olovnikov, A. M. (1972). [The immune response and the process of marginotomy in lymphoid cells]. *Vestn Akad Med Nauk SSSR*, 27(12), 85-87.
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42, 301-334. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130350
- Park, J. I., Venteicher, A. S., Hong, J. Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., . . . Artandi, S. E. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 460(7251), 66-72. doi:10.1038/nature08137
- Pennock, E., Buckley, K., & Lundblad, V. (2001). Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell*, 104(3), 387-396. doi:10.1016/s0092-8674(01)00226-4
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8(10), 785-786. doi:10.1038/nmeth.1701
- Podlevsky, J. D., Bley, C. J., Omana, R. V., Qi, X., & Chen, J. J. (2008). The telomerase database. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D339-343. doi:10.1093/nar/gkm700
- Posadas-Gutiérrez, C. M. (2020). Dinámica de cromosomas de *Ustilago maydis* trt1::Hygr y hda1::Cbxr. *Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.*
- Prescott, J., & Blackburn, E. H. (1997). Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev*, 11(4), 528-540. doi:10.1101/gad.11.4.528
- Pryde, F. E., & Louis, E. J. (1999). Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J*, 18(9), 2538-2550. doi:10.1093/emboj/18.9.2538
- Puhalla, J. E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*, 60(3), 461-474. doi:10.1093/genetics/60.3.461
- Qi, H., & Zakian, V. A. (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev*, 14(14), 1777-1788.
- Qi, X., Li, Y., Honda, S., Hoffmann, S., Marz, M., Mosig, A., . . . Chen, J. J. (2013). The common ancestral core of vertebrate and fungal telomerase RNAs. *Nucleic Acids Res*, 41(1), 450-462. doi:10.1093/nar/gks980
- Qiao, F., & Cech, T. R. (2008). Triple-helix structure in telomerase RNA contributes to catalysis. *Nat Struct Mol Biol*, 15(6), 634-640. doi:10.1038/nsmb.1420
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bolker, M., & Kahmann, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J*, 16(8), 1934-1942. doi:10.1093/emboj/16.8.1934
- Rice, C., & Skordalakes, E. (2016). Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J*, 14, 161-167. doi:10.1016/j.csbj.2016.04.002
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 43(7), e47. doi:10.1093/nar/gkv007
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*, 11(3), R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25

- Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Toton, E., Lisiak, N., Holysz, H., Krolak, A., . . . Rubis, B. (2019). The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Mol Biol Rep*, *46*(1), 1401-1411. doi:10.1007/s11033-018-4496-x
- Rouda, S., & Skordalakes, E. (2007). Structure of the RNA-binding domain of telomerase: implications for RNA recognition and binding. *Structure*, *15*(11), 1403-1412. doi:10.1016/j.str.2007.09.007
- Rubtsova, M., Naraykina, Y., Vasilkova, D., Meerson, M., Zvereva, M., Prassolov, V., . . . Dontsova, O. (2018). Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways. *Nucleic Acids Res*, *46*(17), 8966-8977. doi:10.1093/nar/gky705
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchez-Alonso, P., & Guzman, P. (1998). Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis*. RecQ-like helicase motifs at telomeric regions. *Genetics*, *148*(3), 1043-1054. doi:10.1093/genetics/148.3.1043
- Sanchez-Alonso, P., & Guzman, P. (2008). Predicted elements of telomere organization and function in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, *45 Suppl 1*, S54-62. doi:10.1016/j.fgb.2008.04.009
- Sanchez-Alonso, P., Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O., & Guzman, P. (1996). Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences. *Microbiology (Reading)*, *142 (Pt 10)*, 2931-2936. doi:10.1099/13500872-142-10-2931
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Munch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., . . . Kahmann, R. (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science*, *330*(6010), 1546-1548. doi:10.1126/science.1195330
- Schmidt, J. C., Dalby, A. B., & Cech, T. R. (2014). Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife*, *3*. doi:10.7554/eLife.03563
- Seto, A. G., Livengood, A. J., Tzfati, Y., Blackburn, E. H., & Cech, T. R. (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev*, *16*(21), 2800-2812. doi:10.1101/gad.1029302
- Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L., & Cech, T. R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature*, *401*(6749), 177-180. doi:10.1038/43694
- Shefer, K., Brown, Y., Gorkovoy, V., Nussbaum, T., Ulyanov, N. B., & Tzfati, Y. (2007). A triple helix within a pseudoknot is a conserved and essential element of telomerase RNA. *Mol Cell Biol*, *27*(6), 2130-2143. doi:10.1128/MCB.01826-06
- Sherman, F., Fink, G. R., Hicks, J. B., & Cold Spring Harbor Laboratory. (1986). *Laboratory course manual for methods in yeast genetics*. New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Singer, M. S., & Gottschling, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, *266*(5184), 404-409. doi:10.1126/science.7545955
- Smith-Unna, R., Bournnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M., & Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Res*, *26*(8), 1134-1144. doi:10.1101/gr.196469.115
- Snetselaar, K. M., Bolker, M., & Kahmann, R. (1996). *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, *20*(4), 299-312. doi:10.1006/fghi.1996.0044

- Song, J., Logeswaran, D., Castillo-Gonzalez, C., Li, Y., Bose, S., Aklilu, B. B., . . . Shippen, D. E. (2019). The conserved structure of plant telomerase RNA provides the missing link for an evolutionary pathway from ciliates to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(49), 24542-24550. doi:10.1073/pnas.1915312116
- Spellig, T., Bolker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W., & Kahmann, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, *13*(7), 1620-1627.
- Steczkiewicz, K., Zimmermann, M. T., Kurcinski, M., Lewis, B. A., Dobbs, D., Kloczkowski, A., . . . Ginalski, K. (2011). Human telomerase model shows the role of the TEN domain in advancing the double helix for the next polymerization step. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(23), 9443-9448. doi:10.1073/pnas.1015399108
- Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol*, *18*(2), 61-67. doi:10.1016/j.tcb.2007.11.008
- Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., & Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev*, *11*(1), 83-93. doi:10.1101/gad.11.1.83
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, *27*(7), 1009-1010. doi:10.1093/bioinformatics/btr039
- Tang, W., Kannan, R., Blanchette, M., & Baumann, P. (2012). Telomerase RNA biogenesis involves sequential binding by Sm and Lsm complexes. *Nature*, *484*(7393), 260-264. doi:10.1038/nature10924
- Tarazona, S., Garcia-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res*, *21*(12), 2213-2223. doi:10.1101/gr.124321.111
- Tashiro, S., Nishihara, Y., Kugou, K., Ohta, K., & Kanoh, J. (2017). Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. *Nucleic Acids Res*, *45*(18), 10333-10349. doi:10.1093/nar/gkx780
- Teng, S. C., Epstein, C., Tsai, Y. L., Cheng, H. W., Chen, H. L., & Lin, J. J. (2002). Induction of global stress response in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking telomerase. *Biochem Biophys Res Commun*, *291*(3), 714-721. doi:10.1006/bbrc.2002.6509
- Teng, S. C., & Zakian, V. A. (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *19*(12), 8083-8093.
- Tesmer, V. M., Ford, L. P., Holt, S. E., Frank, B. C., Yi, X., Aisner, D. L., . . . Wright, W. E. (1999). Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol Cell Biol*, *19*(9), 6207-6216. doi:10.1128/mcb.19.9.6207
- Theimer, C. A., Blois, C. A., & Feigon, J. (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol Cell*, *17*(5), 671-682. doi:10.1016/j.molcel.2005.01.017
- Tsukuda, T., Bauchwitz, R., & Holloman, W. K. (1989). Isolation of the REC1 gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene*, *85*(2), 335-341. doi:10.1016/0378-1119(89)90426-5
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., & Holloman, W. K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, *8*(9), 3703-3709. doi:10.1128/mcb.8.9.3703

- Tzfati, Y., & Chen, J. J.-L. (2012). Telomerase RNA: Structure, Function, and Molecular Mechanisms. In N. F. Lue & C. Autexier (Eds.), *Telomerases* (pp. 23-51): John Wiley and Sons.
- Tzfati, Y., Knight, Z., Roy, J., & Blackburn, E. H. (2003). A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes Dev*, *17*(14), 1779-1788. doi:10.1101/gad.1099403
- Ueda, C. T., & Roberts, R. W. (2004). Analysis of a long-range interaction between conserved domains of human telomerase RNA. *RNA*, *10*(1), 139-147. doi:10.1261/rna.5118104
- Ulyanov, N. B., Shefer, K., James, T. L., & Tzfati, Y. (2007). Pseudoknot structures with conserved base triples in telomerase RNAs of ciliates. *Nucleic Acids Res*, *35*(18), 6150-6160. doi:10.1093/nar/gkm660
- Vasianovich, Y., & Wellinger, R. J. (2017). Life and Death of Yeast Telomerase RNA. *J Mol Biol*, *429*(21), 3242-3254. doi:10.1016/j.jmb.2017.01.013
- Walmsley, R. W., Chan, C. S., Tye, B. K., & Petes, T. D. (1984). Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature*, *310*(5973), 157-160. doi:10.1038/310157a0
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, *43*(6), 904-914. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, *239*(94), 197-201. doi:10.1038/newbio239197a0
- Webb, C. J., & Zakian, V. A. (2008). Identification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* TER1 telomerase RNA. *Nat Struct Mol Biol*, *15*(1), 34-42. doi:10.1038/nsmb1354
- Webb, C. J., & Zakian, V. A. (2015). Telomerase RNA stem terminus element affects template boundary element function, telomere sequence, and shelterin binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(36), 11312-11317. doi:10.1073/pnas.1503157112
- Witkin, K. L., & Collins, K. (2004). Holoenzyme proteins required for the physiological assembly and activity of telomerase. *Genes Dev*, *18*(10), 1107-1118. doi:10.1101/gad.1201704
- Wyatt, H. D., West, S. C., & Beattie, T. L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res*, *38*(17), 5609-5622. doi:10.1093/nar/gkq370
- Xia, J., Peng, Y., Mian, I. S., & Lue, N. F. (2000). Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*, *20*(14), 5196-5207. doi:10.1128/MCB.20.14.5196-5207.2000
- Xie, M., Mosig, A., Qi, X., Li, Y., Stadler, P. F., & Chen, J. J. (2008). Structure and function of the smallest vertebrate telomerase RNA from teleost fish. *J Biol Chem*, *283*(4), 2049-2059. doi:10.1074/jbc.M708032200
- Yang, L., Duff, M. O., Graveley, B. R., Carmichael, G. G., & Chen, L. L. (2011). Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biol*, *12*(2), R16. doi:10.1186/gb-2011-12-2-r16
- Yu, E. Y., Hsu, M., Holloman, W. K., & Lue, N. F. (2018). Contributions of recombination and repair proteins to telomere maintenance in telomerase-positive and negative *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, *107*(1), 81-93. doi:10.1111/mmi.13866
- Yu, E. Y., Kojic, M., Holloman, W. K., & Lue, N. F. (2013). Brh2 and Rad51 promote telomere maintenance in *Ustilago maydis*, a new model system of DNA repair

- proteins at telomeres. *DNA Repair (Amst)*, 12(7), 472-479. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.027
- Zappulla, D. C., & Cech, T. R. (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27), 10024-10029. doi:10.1073/pnas.0403641101
- Zappulla, D. C., Goodrich, K., & Cech, T. R. (2005). A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat Struct Mol Biol*, 12(12), 1072-1077. doi:10.1038/nsmb1019
- Zhong, Z. H., Jiang, W. Q., Cesare, A. J., Neumann, A. A., Wadhwa, R., & Reddel, R. R. (2007). Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem*, 282(40), 29314-29322. doi:10.1074/jbc.M701413200

ANEXOS

Anexo A

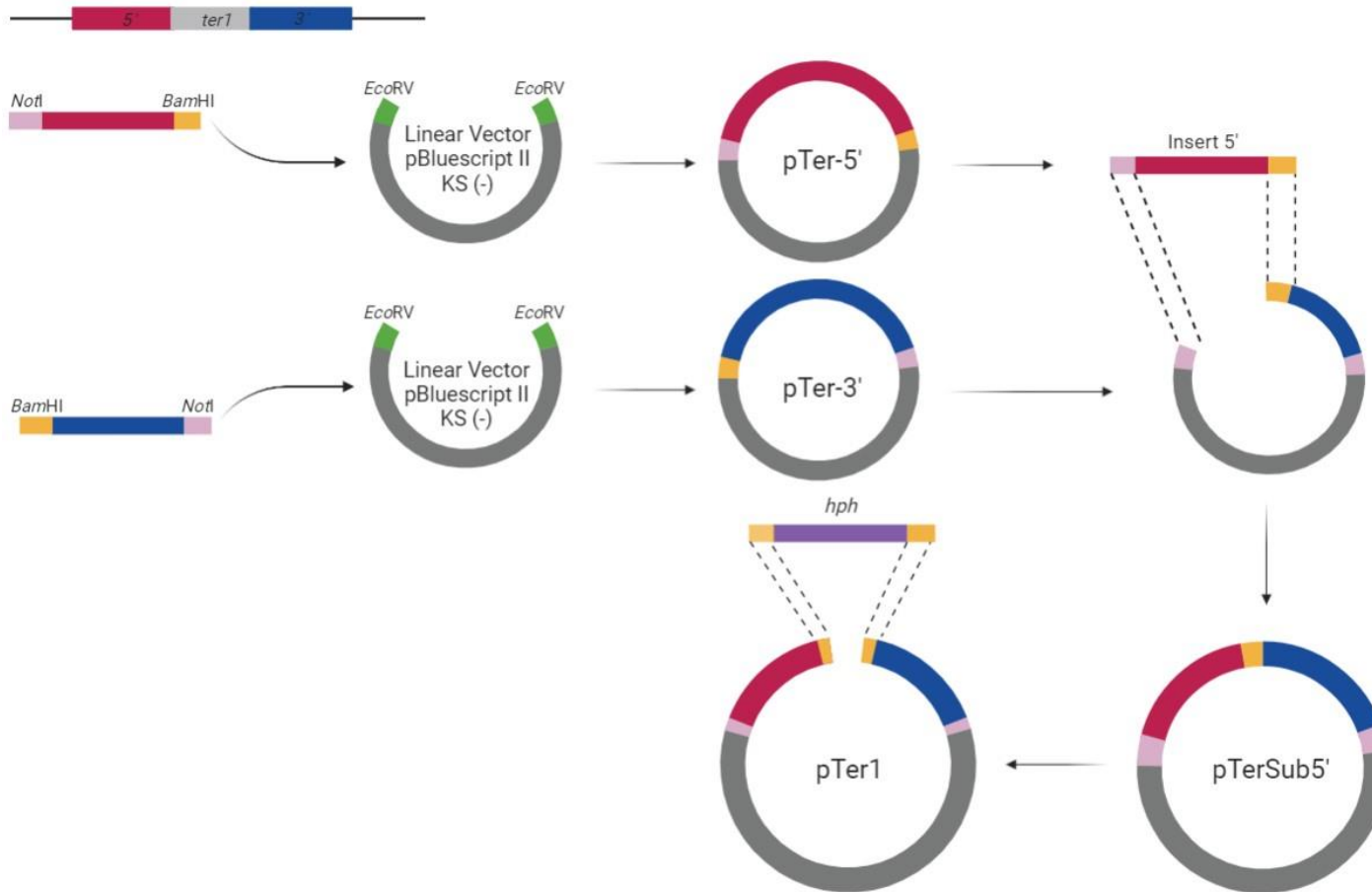


Figura A1. Diagrama del ensamblaje de la secuencia de interrupción para *ter1*. Fragmentos de aproximadamente 1,000 pb de los extremos flanqueantes 5' y 3' de *ter1* fueron amplificados por PCR. El extremo 5' fue bordeado por sitios de corte *NotI* y *BamHI*, y el extremo 3' por sitios de corte *BamHI* y *NotI*. Cada fragmento fue insertado en el sitio *EcoRV* del vector pBluescript II KS (-). El fragmento 5' del plásmido pTer-5' fue escindido por doble digestión con *NotI*/*BamHI* y subclonado en el sitio *NotI*/*BamHI* de pTer-3'. El plásmido resultante pTerSub5' fue linearizado con *BamHI*, para realizar la ligación del fragmento *BamHI* derivado de pCM1007, que contenía el gen quimérico *hph*. Obteniendo el plásmido pTer1 con la secuencia de interrupción para *ter1*.

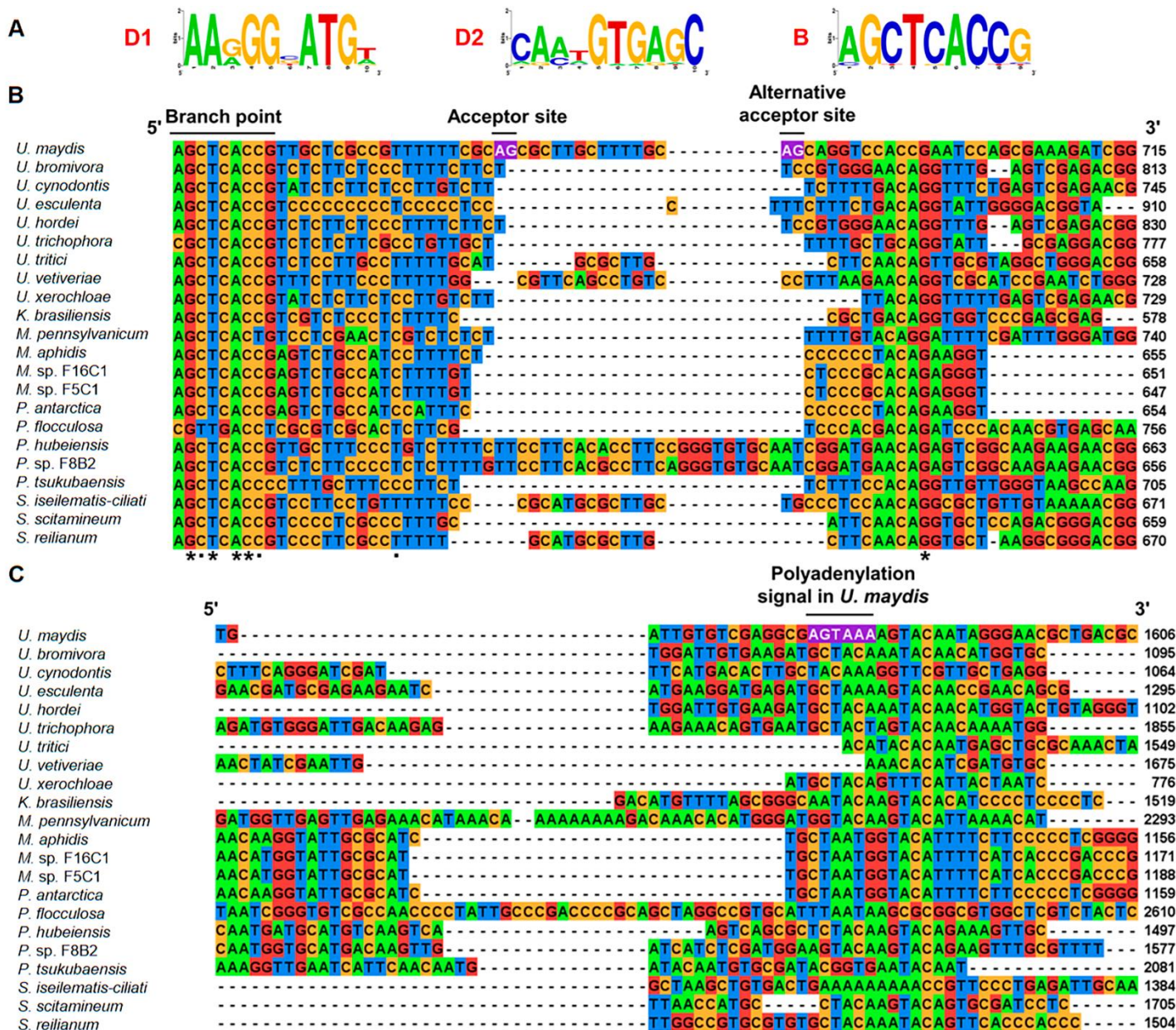


Figura A3. Sitos de procesamiento de *UMAG_03168* y *ter1*. (A) WebLogo de los sitios de empalme de *UMAG_03168*. D1 corresponde a la secuencia del sitio donador utilizado en el procesamiento de KIS68596 y *ter1*-i4, D2 corresponde al sitio donador alternativo empleado para el procesamiento de las isoformas 2 y 3 de *ter1*, B corresponde a la secuencia del sitio de ramificación utilizado en el procesamiento de las diversas isoformas observadas. (B) Alineamiento múltiple de la localización del sitio de ramificación y sitios aceptores localizados en *U. maydis*. (C) Alineamiento múltiple del extremo final 3' del locus *ter1*. Región final del locus *ter1* en donde se identificó una posible señal de poliadenilación, que se localiza en una región rica en residuos de A en especies de Ustilaginales.

Tabla A1. Localización del *locus ter1* y motivos identificados en especies de Ustilaginales.

Cepa	Número de acceso	Cadena	Coordenadas <i>ter1</i>	Localización de motivos dentro del <i>locus ter1</i>						Longitud mínima estimada de TER
				CE1	CE2	CE3	Templete	P6.1-like	Sitio Sm-like	
<i>Ustilago maydis</i> 521	NC_026485.1	pos.	126,081 - 127,706	131 - 139	141 - 148	221 - 228	385 - 393	1,053 - 1,070	1,209 - 1,217	1,086 nt
<i>Ustilago bromivora</i> UB2112	LT558124.1	pos.	809,965 - 811,082	83 - 91	93 - 100	128 - 135	258 -268	764 - 781	894 - 902	819 nt
<i>Ustilago cynodontis</i> NBRC 9727	LZZZ01000128.1	neg.	16,964 - 18,032	64 - 72	74 - 81	111 - 118	248 -258	713 - 731	804 - 812	748 nt
<i>Ustilago esculenta</i> MMT	JTLW01000040.1	neg.	82,132 - 83,476	129 - 137	139 - 146	164 - 171	285 -295	975 - 992	1,074 - 1,082	953 nt
<i>Ustilago hordei</i> Uh4857-4	CAGI01000168.1	neg.	102,049 - 103,205	78 - 86	88 - 95	123 - 130	253 - 263	760 - 777	893 - 901	823 nt
<i>Ustilago trichophora</i> RK089	LVYE01000100.1	neg.	84,657 - 86,536	59 - 67	69 - 76	95 - 102	235 - 245	1,305 - 1,322	1,433 - 1,441	1,382 nt
<i>Ustilago tritici</i> Utri01	NSHH01000016.1	neg.	76,196 - 77,768	94 - 102	104 - 111	161 - 168	282 - 292	1,270 - 1,289	1,383 - 1,391	1,297 nt
<i>Ustilago vetiveriae</i> RK 075	MAIM01000068.1	neg.	42,195 - 43,871	100 - 108	110 - 117	218 - 225	382 -392	1,230 - 1,249	1,362 - 1,370	1,270 nt
<i>Ustilago xerochloae</i> UMa702	MAIN01000012.1	pos.	93,935 - 94,718	72 - 80	82 - 89	112 - 119	215 - 225	548 - 566	620 - 628	556 nt
<i>Kalmanozyma brasiliensis</i> GHG001	NW_015961990.1	pos.	641,734 - 643,254	84 - 92	94 -101	141 - 148	271 -281	1,155 - 1,172	1,234 - 1,242	1,158 nt
<i>Melanopsichium pennsylvanicum</i> 4	HG529599.1	neg.	30,592 - 32,937	187 - 195	198 - 205	240 - 247	437 - 447	1,731 - 1,748	1,888 - 1,896	1,709 nt
<i>Moesziomyces aphidis</i> DSM 70725	AWNIO1000039.1	neg.	642,319 - 643,481	110 - 118	120 - 127	142 - 149	263 - 273	918 - 935	991 - 1,000	890 nt
<i>Moesziomyces</i> sp. F16C1	NXFS01000005.1	neg.	654,777 - 655,954	110 - 118	120 - 127	142 - 149	263 - 273	925 - 942	998 - 1,007	897 nt
<i>Moesziomyces</i> sp. F5C1	NXFR01000006.1	pos.	77,429 - 78,623	110 - 118	120 - 127	142 - 149	260 -270	947 - 964	1,020 - 1,029	919 nt
<i>Pseudozyma antarctica</i> T-34	DF196780.1	neg.	645,527 - 646,691	110 - 118	120 - 127	142 - 149	263 - 273	921 - 938	994 - 1,003	893 nt
<i>Pseudozyma flocculosa</i> PF-1	KE361642.1	pos.	197,617 - 200,285	363 - 371	373 - 380	409 - 416	621 - 631	2,011 - 2,027	2,313 - 2,321	1,958 nt
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> NBRC 105055	MAIO01000009.1	neg.	276,656 - 278,159	88 - 96	98 - 105	229 - 236	412 - 422	1,124 - 1,141	1,226 - 1,234	1,136 nt
<i>Pseudozyma</i> sp. F8B2	NXFQ01000007.1	pos.	62,471 - 64,051	87 - 95	97 - 104	230 -237	412 - 422	1,189 - 1,206	1,304 - 1,312	1,225 nt
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> NBRC 1940	MAIP01000052.1	pos.	136,067 - 138,147	57 - 65	68 - 75	140 -147	303 - 313	1,635 - 1,652	1,807 - 1,815	1,758 nt
<i>Sporisorium iseilematis-ciliati</i> BRIP 60887	MJEU01000134.1	neg.	26,976 - 28,372	95 - 103	105 - 112	149 - 156	262 - 272	1,076 - 1,093	1,169 - 1,177	1082 nt
<i>Sporisorium scitamineum</i> SSC39B	CP010922.1	neg.	106,276 - 107,980	100 - 108	110 - 117	167 - 174	274 - 284	1,396 - 1,413	1,513 - 1,521	1,421 nt
<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2	FQ311473.1	neg.	71,402 - 72,916	90 -98	100 - 107	156 - 163	265 - 275	1,177 - 1,196	1,294 - 1,302	1,212 nt

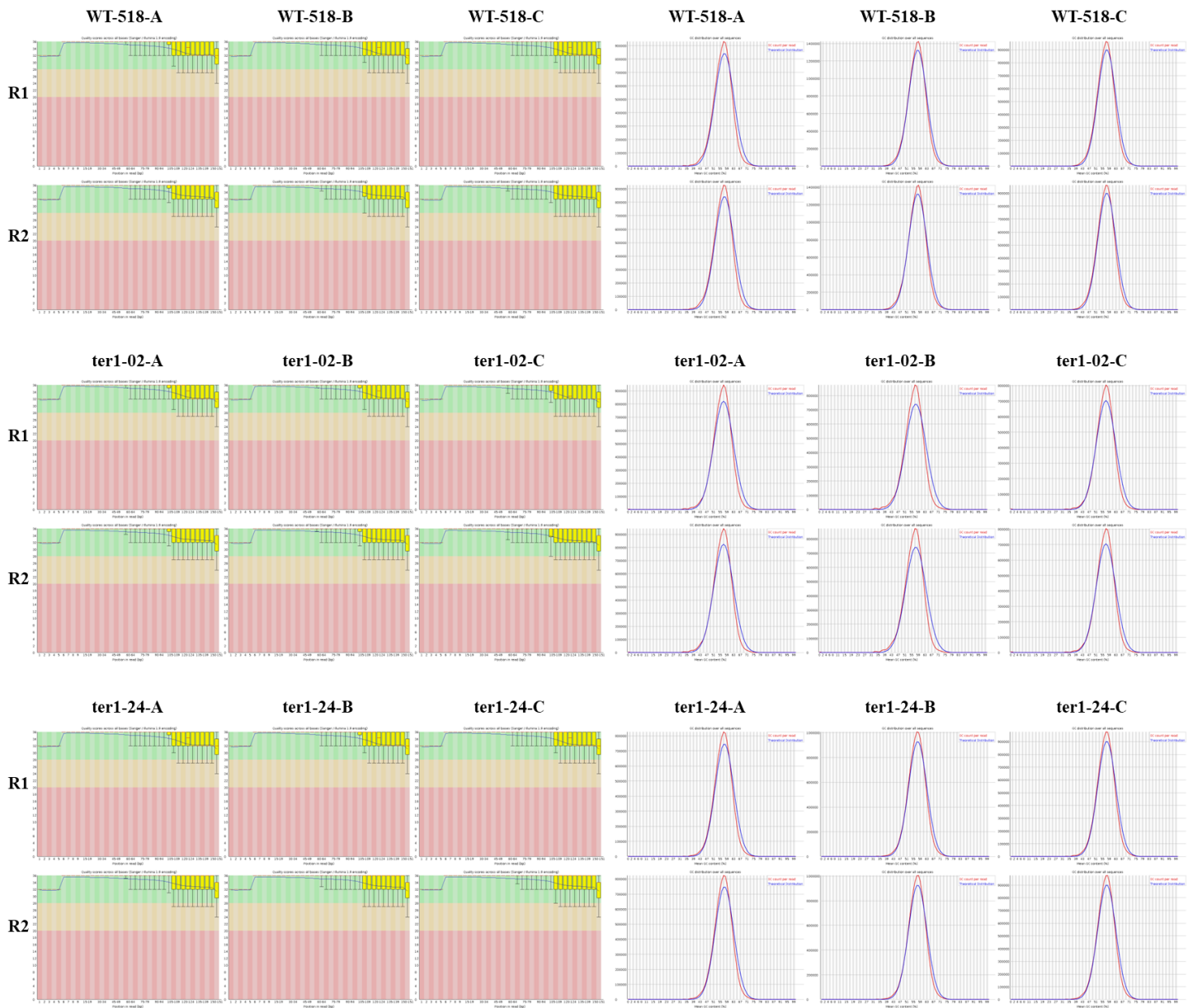


Figura A4. Evaluación de la calidad de las lecturas y distribución del contenido de GC para las muestras WT-518 y mutantes *ter1::hph*.

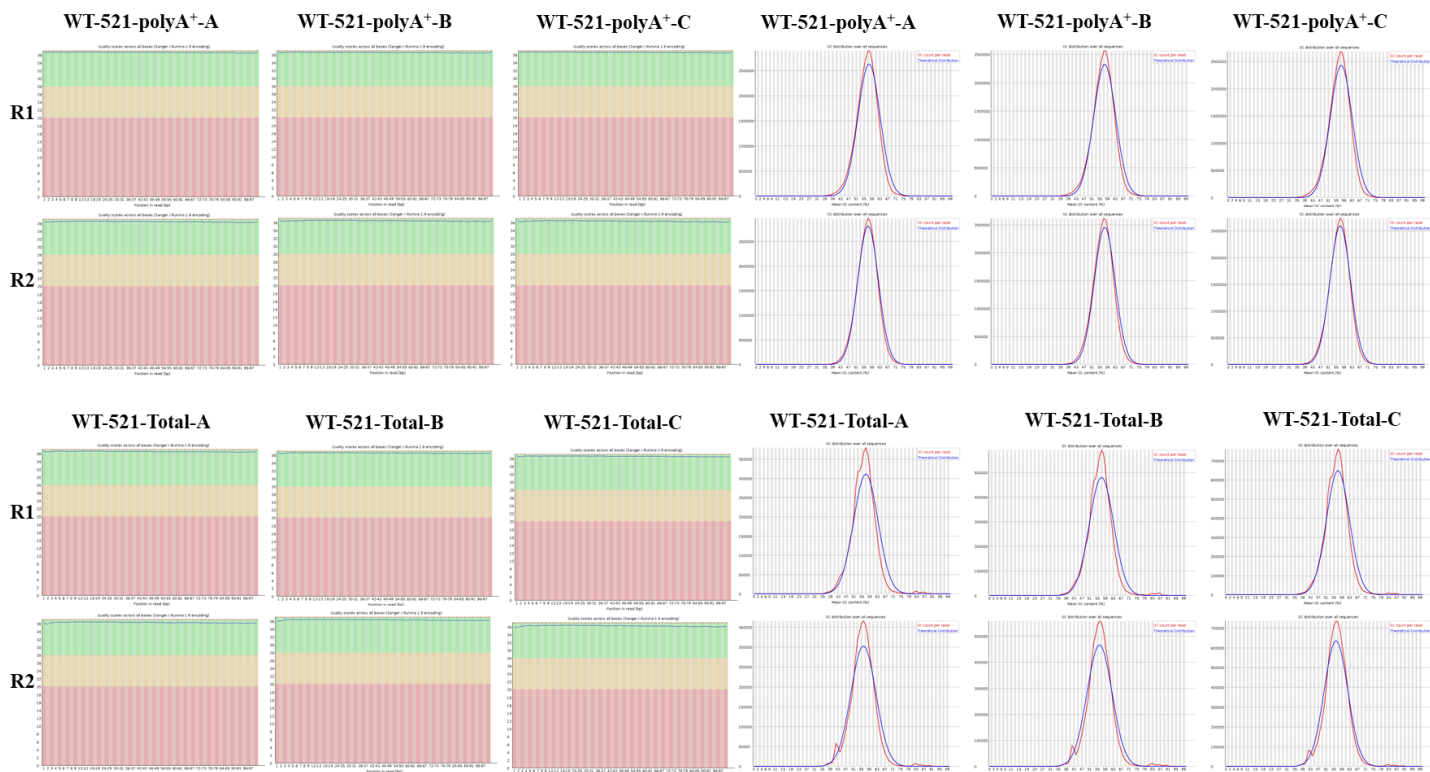


Figura A5. Evaluación de la calidad de las lecturas y distribución del contenido de GC para las muestras de las fracciones nucleares de la cepa WT-521.

Tabla A2. Contenido de *hits* en las librerías de las fracciones nucleares de la cepa WT-521 para la consulta de la base de datos de ARNr y ADNmt de *U. maydis*.

Muestra	Librería	Número de pares de lecturas	rRNA hits	% rRNA	Genoma mitocondrial hits	% Genoma mitocondrial
WT-521-polyA ⁺ -A	SN1_S33_L001_R1_001.fastq	41,845,456	1,651,596	3.95	66,053	0.16
	SN1_S33_L001_R2_001.fastq		1,612,950	3.85	64,993	0.16
WT-521-polyA ⁺ -B	SN2_S34_L001_R1_001.fastq	35,613,788	634,342	1.78	38,002	0.11
	SN2_S34_L001_R2_001.fastq		627,754	1.76	37,916	0.11
WT-521-polyA ⁺ -C	SN3_S35_L001_R1_001.fastq	39,274,436	2,192,031	5.58	108,112	0.28
	SN3_S35_L001_R2_001.fastq		2,149,619	5.47	106,923	0.27
WT-521-Total-A	SN1_S123_L002_R1_001.fastq	19,110,343	4,242,719	22.20	8,762,244	45.85
	SN1_S123_L002_R2_001.fastq		3,911,565	20.47	8,443,983	44.19
WT-521-Total-B	SN2_S124_L002_R1_001.fastq	23,857,473	4,568,073	19.15	10,631,577	44.56
	SN2_S124_L002_R2_001.fastq		4,401,827	18.45	10,495,419	43.99
WT-521-Total-C	SN3_S125_L002_R1_001.fastq	29,057,924	4,817,642	16.58	13,398,507	46.11
	SN3_S125_L002_R2_001.fastq		4,690,694	16.14	13,259,304	45.63

Global gene expression of post-senescent telomerase negative *ter1Δ* strain of *Ustilago maydis*

Juan Antonio Sanpedro-Luna¹, Leticia Alvarado-Vega², Candelario Vázquez-Cruz³ and Patricia Sánchez-Alonso^{3,*}

¹ Posgrado en Microbiología, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; juan.sanpedro@alumno.buap.mx

² Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; leticia.vega@icat.unam.mx

³ Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; candelario.vazquez@correo.buap.mx

* Correspondence: maria.sanchez@correo.buap.mx; Tel.: (+52 222 229 5500 ext. 2534)

Abstract: We analyzed the global expression patterns of telomerase-negative mutants from haploid cells of *Ustilago maydis* to identify the gene network required for cell survival in the absence of telomerase. Mutations in either of the genes of the telomerase core subunits (Trt1 and Ter1) of the dimorphic fungus *U. maydis* cause deficiencies in teliospore formation. We report the global transcriptome analysis of two *ter1Δ* survivor strains of *U. maydis*, revealing the deregulation of telomerase-deleted responses (TDR) genes, such as DNA damage response, stress response, cell cycle, subtelomeric, and proximal telomere genes. Other differentially expressed genes (DEGs) found in the *ter1Δ* survivor strains were related to pathogenic lifestyle factors, plant-pathogen crosstalk, iron uptake, meiosis, and melanin synthesis. The two *ter1Δ* survivors were phenotypically comparable, yet DEGs were identified when comparing these strains. Based on our findings, we propose that teliospore formation in *U. maydis* is controlled by key pathogenic lifestyle and meiosis genes.

Keywords: telomerase; *ter1* mutants; transcriptome analysis

1. Introduction

Telomerase is the ribonucleoprotein complex that solves the end replication problem by replenishing the telomere repeated motifs lost after each replication round. Telomerase does this using its unique and essential reverse-transcriptase activity [1, 2]. The core components of this enzymatic complex are a protein subunit called *telomerase reverse transcriptase* (TERT), which is responsible for the catalytic activity, and a lncRNA called *telomerase RNA* (TER) or *telomerase RNA component* (TERC) that serves as a scaffold for assembly of the holoenzyme and carries the RNA template for the synthesis of the telomere repeated motif [3]. Telomerase is the predominant pathway for telomere lengthening in most eukaryotic cells [1]; in the absence of the enzyme, the telomere shortens as replication rounds increase. In somatic cells of higher eukaryotes, the *TERT* gene is downregulated as the cellular differentiation program advances [4]. However, different quantities of telomerase activity have been detected in the embryo-growing tissues and remain present in metazoans' highly proliferative cell lineages, as in germ line tissues, stem, multipotential cells, and, unfortunately, also in cancer cells [5, 6].

In *Saccharomyces cerevisiae*, telomerase activity is expressed at the late S-phase during an undetermined number of replication rounds [7]. This is because the yeast *TLC1* RNA subunit is expressed in an S-phase-dependent fashion, whereas the catalytic subunit *EST2* depends on *TLC1* abundance [8, 9]. When the telomerase activity is abolished in the *tlc1* cells, the telomeres shorten and senescence set out.

When a critical telomere shortening threshold is reached, most of the cells stop growing and die; at any point after this, in the post-senescent culture, survivor cells may arise [10, 11]. In these survivor cells, the DNA recombination mechanisms enable the enlargement of the chromosome termini via two routes known as alternative lengthening of telomere (ALT). Type I survivors are characterized by the over-amplification of Y' subtelomeric elements interposed by small fragments of telomeric repeats, while Type II survivors present long heterogeneous tracts of telomeric repeats. [12, 13]. Multiple research groups have investigated the mechanisms involved in triggering each survivor type [14, 15]. The Type I survivors rely on Rad52 activity, in addition to that of Rad51, Rad54, Rad55, Rad57, Rif1, Rif2 and of nine other non-telomeric proteins. Lack of any of them increases the Type II/Type I surviving rate. Type II survivors depend on Rad52 and Sgs1 helicase, as well as on Mre11, Rad50, Xrs2, Rad59, Tel1, Mdt1, Def1, Clb2, and Sua5 and 22 other non-telomeric proteins [15]. Epigenetic mechanisms seem to also be involved in controlling the expression of these survivor genes [14].

Transcriptome analyses of *tlc1* mutants of *S. cerevisiae* along the cell progression (pre-senescent, senescent, post-senescent cell stages) have been achieved to identify the network of genes involved in cell surviving in the absence of telomerase [16, 17]. In those studies, several genes – named telomerase-deleted response (TDR) genes – were found to be de-regulated, with some of them displaying a log₂ fold change (logFC) in transcriptional expression ≥ 2 [16]. Among those TDRs genes, many are involved in responses to heat shock, MMS, and environmental stresses. Moreover, the global transcriptome of telomerase-negative mutants of diverse species is characterized by the expression of a related subset of genes involved in several abiotic stress responses, earlier named the core environmental stress response (CESR) genes when identified in *S. pombe* [18]. Additionally, in other lower eukaryotic species, the CESRs are also de-regulated when telomerase activity is depleted [19, 20], but still, a small subgroup of up-regulated genes – which are rarely shared in other genotoxic responses – were unique hallmarks of telomerase deprivation in *S. cerevisiae* and have been named telomerase-deleted signature (TDS) genes [17].

TDR includes genes from carbohydrate metabolism, protein synthesis, folding, membrane structure, membrane trafficking, and genes harbored in subtelomeric sequences. The wider number and deepest response of TDR genes are attained when chromosomes reach the shortest telomere length; then, most of the genes return to a middle stage of deregulation in the survivor phase of the cells [17]; more recently, it has been reported that the TDR is extended to deregulation of some non-coding RNAs [21].

Multiple research groups have successfully addressed the efforts to elucidate the details of telomere metabolism in the basidiomycetous model organism *U. maydis*, which has reported the telomere structure and drafted its organization [22-25]. The two core subunits of the telomerase complex have been identified and partially characterized by Sanpedro-Luna et al. 2023 and Bautista-España et al. 2014, in addition, several hypothetical genes of the shelterin complex subunits have been identified, and some genes of the recombination machinery involved in chromosomal end maintenance have been characterized [24, 26, 27].

The TER subunit of the *U. maydis* telomerase is located on chr 8 as an overlapping sense lncRNA spanning the last exon of *UMAG_03168* and the proximal intergenic sequence *ter1* of 1,626 bp (GenBank TPA: BK059259). The length of the gene has been calculated as at least 1280 bp; it transcribes more than one isoform, but the characterization of a full set of transcript products remains to be completed [28].

Here, we report the global transcriptome analysis of two *ter1* Δ strains of *U. maydis*. Many of the identified TDRs are shared with other TER-disrupted fungi, but we also identify de-regulated genes involved in meiosis, pathogenic development, and pathogen-plant crosstalk. Although a similar pattern of differentially expressed genes (DEGs) was found in both *ter1* Δ strains, they were not identical. In both strains, some genes involved in the pathogenic-mycelium lifestyle were de-regulated in sporidia, suggesting an early interference with their ability to cross-fertilize with compatible strains and complete the life cycle.

2. Materials and Methods

Strains and culture medium

The *U. maydis* 518 (*a2b2*) strain was previously donated by WK. Holloman (Cornell Weill Medical Center NY), the telomerase-negative derivative strains *ter1-02* and *ter1-24* (*a2b2*, *ter1::hph*) were constructed and characterized as previously described by Sanpedro-Luna et al. 2023. The parental strain was used as a control. All the strains were grown in YEPS medium (1% yeast extract, 1% peptone, 2% sucrose) at 28°C, supplemented with hygromycin (150 μ g/ml) when necessary.

RNA isolation and transcriptome sequencing

RNA extraction was performed as previously described by Sanpedro-Luna et al. 2023. For the elaboration and sequencing of cDNA libraries, the services of the Laboratorios Nacionales de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) of the Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV) were used. The cDNA libraries were prepared using the TruSeq RNA Sample Preparation v2 LT kit (Illumina Inc.), and sequencing was performed on the Illumina NextSeq 500 platform, generating reads of 150 bp paired-ends.

Data analysis

The quality of the RNA-Seq reads was evaluated with the FastQC software [29]. Trimming of adapters and removal of poor-quality reads was performed with Trimmomatic v0.36 [30], keeping the read-pairs with values greater than 25 nt in length and quality greater than 30 for the analysis. As part of the Trinity v2.11.0 pipeline [31], reads were aligned to the coding sequences (CDS) of the genome of the 521 strain, downloaded from the Ensembl database (https://ftp.ensemblgenomes.ebi.ac.uk/pub/fungi/release-56/fasta/ustilago_maydis/cds/Ustilago_maydis.Umaydis521_2.0.cds.all.fa) using Bowtie2 v2.4.2 [32]. Next, the quantification of transcript abundances was carried out with the RSEM v1.3.3 program [33]. For the differential expression analysis, the count matrices generated in the previous step were uploaded to the IDEAMEX online platform (<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>; [34] to use DESeq2 [35], NOISeq [36], Limma-Voom [37], and EdgeR [38], the cutoff values used to consider the genes as differentially expressed were: $\log_{2}FC \geq 2$ and $FDR \leq 0.01$. Raw sequencing reads and expression data were submitted to the Gene Expression Omnibus of NCBI (accession number: GSE225422).

Annotation and classification of differentially expressed transcripts

The annotation of the resulting transcripts and products was carried out using the Trinotate v3.2.2 pipeline [39]; the sequences were analyzed by use of the BLAST software packages [40] and the databases UniProt, Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and EggNog, applying the cutoff e-value of 10^{-5} . Next, protein domains were sought in the outcomes employing the hmmer v3.3.1 software of Trinotate suite and the database Pfam-A. Likewise, SignalIP v4.1 and TMHMM v2.0c programs were used to seek the cleavage sites of signal peptides and to predict transmembrane helix [41-43].

DEGs were selected, and heatmaps were plotted using the RStudio v1.4.1103 package (RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, <http://www.rstudio.com>). Finally, using the OmicsBox v1.4.12 pipeline (Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics, March 3, 2019, <https://www.biobam.com/omicsbox>), the GO identifiers of DEGs were filtered by taxonomy (fungi) and classified by functional annotation.

3. Results and Discussion

3.1. Sequencing and quality control of RNA-seq libraries

The global expression profile of TER-deleted mutants at the surviving stage was analyzed using RNA-seq libraries of the parental strain 518 and of its telomerase-negative derivatives *ter1-02* and *ter1-24*. The assays were elaborated in triplicate and sequenced using the Illumina NextSeq 500 platform, yielding a total of 126,587,419 paired reads from nine libraries. After raw read processing, a total of 110,227,520 paired reads were preserved (Table S1). The alignment percentages of the processed reads against the reference sequences with Bowtie 2 are shown in Table S1.

3.2. Changes in the expression profile of telomerase-RNA-deletion response (TDR) genes

To identify the DEGs between the parental strain and *ter1Δ* mutants, the reads mapping to the reference transcripts were used for the analysis of differential expression on the IDEAMEX platform, setting up as cutoff points: $\log_{2}FC \geq 2$ and $FDR \leq 0.01$, and were only considered as differentially expressed the genes appearing at the intersection of those obtained with DESeq2, NOISeq, Limma-Voom and EdgeR. Likewise, the changes in the expression profile between *ter1-02* vs. *ter1-24* mutants were compared to find the differences exhibited by both mutants [28].

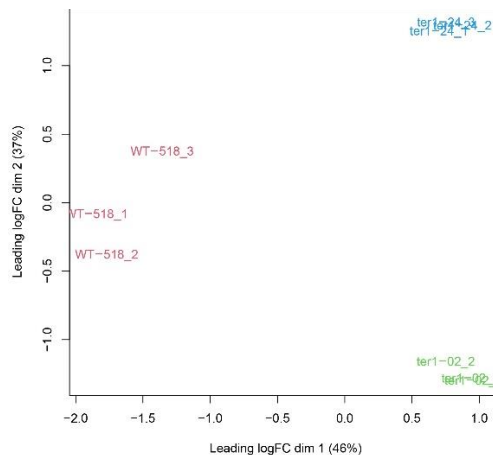


Figure 1. MDS plot. RNA-seq samples are grouped in separate clusters reflecting variations between them.

Concurrently with the differential expression analysis, the input data were analyzed to detect variations between the samples. In Figure 1, replica sets of each strain analyzed are shown in the multi-dimensional scaling (MDS) graph; as they were grouped in separate clusters, variations in the expression patterns were substantiated for each sample. From 6783 protein-coding genes analyzed, 241 (3.55%) were detected as over-expressed DEGs when compared to WT and *ter1-02* transcriptomes, whereas 276 DEGs were identified after the comparison of WT and the *ter1-24* transcriptomes. Of these, 246 genes (3.62%) were found over-expressed, and 30 (0.44%) were found repressed in the mutant strain.

To complete the analysis, a comparison of *ter1-24* and *ter1-02* transcriptomes led us to discover 211 (3.11%) DEGs in the *ter1-24* mutant relative to *ter1-02*, of which 70 genes (1.03%) were overexpressed and 141 (2.07%) were repressed (Figure 2). Once identified, the DEGs were retrieved and examined to identify the sets of unique and shared genes from each analysis. In *U. maydis*, deletion of TER causes the deregulation of a core of 90 genes shared by the two TER-mutants, hence named core genes; this represents 1.32% of the total coding genes. Eight of those genes showed clear differences in transcriptional expression among the mutants. When the search for unique DEGs was carried out for each pair of transcriptomes analyzed, 57 genes were identified for *ter1-02*, and 124 genes were identified for *ter1-24*. When the differential analysis was carried out against wild-type, 47 unique DEGs were identified when comparing *ter1-24* to *ter1-02* (Figure 3A).

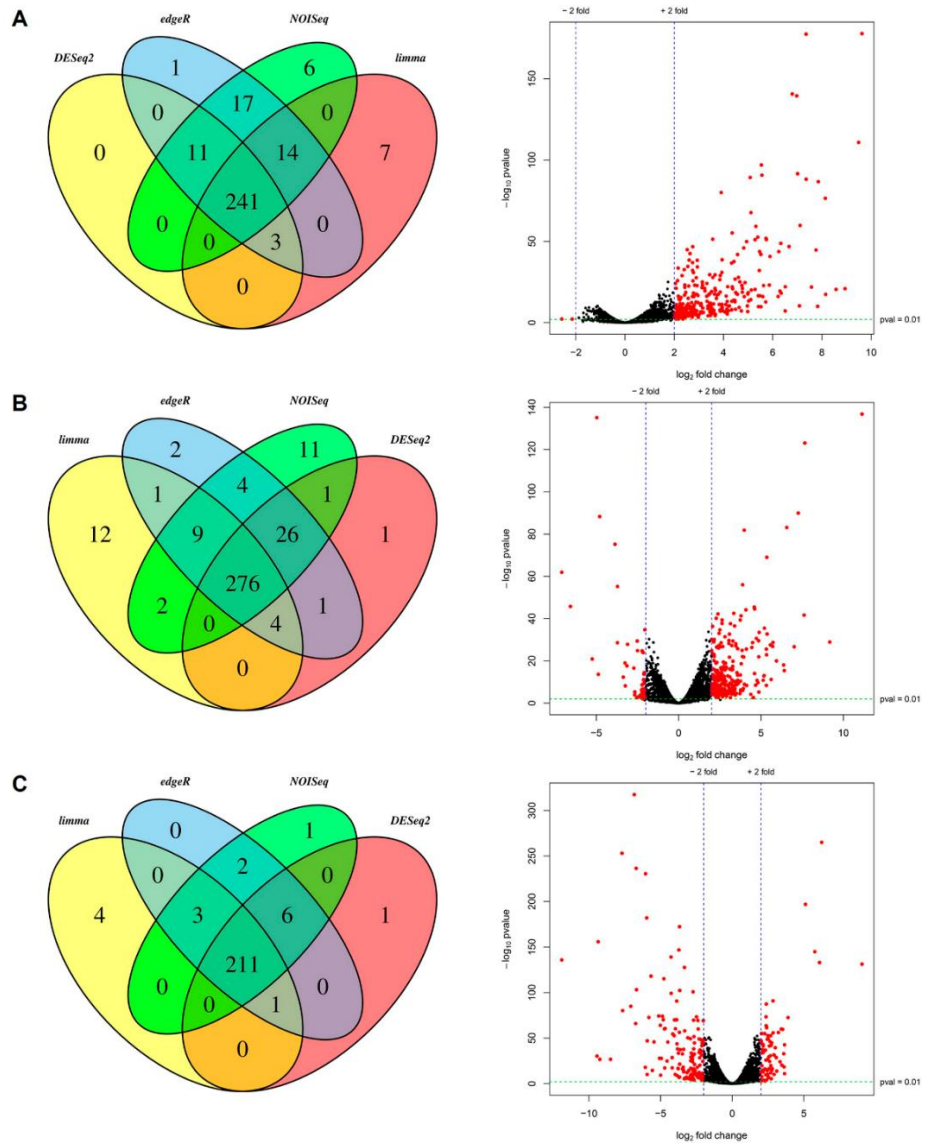


Figure 2. Venn diagrams and distribution of DEGs. The Venn diagrams show the number of DEGs and intersections between each method used. The volcano plots are the distribution of DEGs (red dots) according to the selected cutoff values. (A) Differential expression analysis between strain WT 518 and mutant *ter1-02*. (B) Differential expression analysis between strain WT 518 and mutant *ter1-24*. (C) Differential expression analysis between *ter1-02* and *ter1-24* mutants.

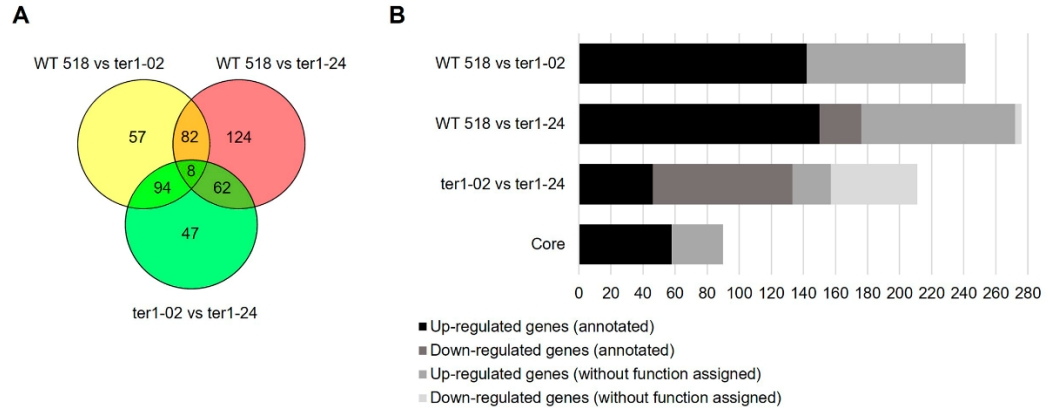


Figure 3. Venn diagram and statistics of the DEGs annotation. (A) Representation of the unique and shared DEGs among the analyzed transcriptomes. (B) Grouping of DEGs concerning functional annotation assignment.

3.3. Annotation and Functional Assignment

To examine how DEGs contribute to the survivor phenotype in *U. maydis*, the core genes and DEGs recovered from the former analysis were forwarded for functional annotation and GO analysis using the Trinotate pipeline and OmicsBox, respectively. For the DEGs from ter1-24 vs. the WT 518 strain, it was found that $\approx 36\%$ of the genes do not share homology with any of the sequences deposited in the protein databases accessed and therefore considered without assigned function. Regarding the DEGs from a comparison of ter1-02 vs. 518 transcriptomes, the percentage of genes without assigned function increased to $\approx 41\%$ (Figure 3B). From the annotation of the total set of coding genes, 26% corresponds to genes without any function assigned. Thus, the role of more than a quarter of the coding genes remains to be elucidated; even more interesting is the finding that these genes only represent a small percentage of the global transcriptome of *U. maydis* previously calculated by Donaldson et al. 2017, and by our group [28].

To determine which of the cellular functions were affected by TER deletion, DEGs were grouped into the three categories of the GO analysis: biological process (BP), molecular function (MF), and cellular component (CC). Figure 4A shows the ten most representative classes of each category of the GO for the DEGs identified in both *ter1*-disrupted mutants. In the BP category, the highest proportion of overexpressed DEGs match with genes involved in cellular processes (82 DEGs in ter1-02, 100 DEGs in ter1-24) and metabolic processes (87 DEGs in ter1-02, 97 DEGs in ter1-24) followed by genes involved in localization and response to stimuli (25 and 24 DEGs in ter1-02, and 28 and 30 DEGs in ter1-24, respectively). In the case of downregulated DEGs from ter1-24, GO analysis showed 23 downregulated DEGs, which are involved in cellular processes, 15 DEGs in metabolic processes, and ten DEGs in cellular localization as the most representative categories; remarkably, there also were downregulated genes from multi-organism processes and stimuli response (five and three DEGs respectively).

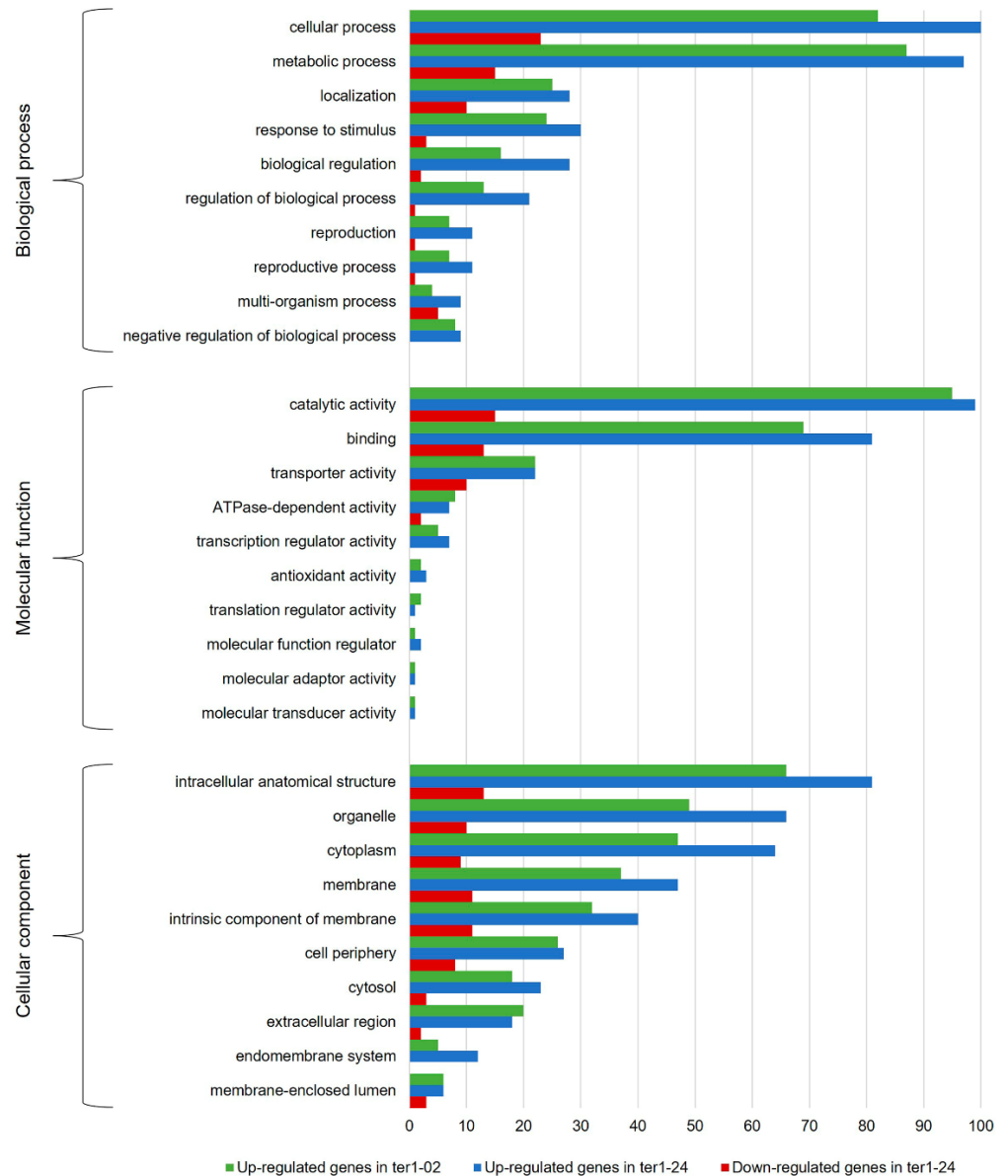


Figure 4. GO classification histogram of the DEGs identified in the *ter1* mutants. The graph shows the ten most representative assignments for the categories biological process (level 2), molecular function (level 2) and cellular component (level 3).

Regarding the MF category of the GO analysis, the main enrichment of up-regulated genes in *ter1-02* occurred in those categories of catalytic activity (95 DEGs), binding capability (69 DEGs), and transporter activity (22 DEGs); likewise, in *ter1-24* overexpressed genes also were from catalytic activity (99 DEGs), binding capability (81 DEGs), and transporter activity (22 DEGs). Downregulated DEGs in the same MF categories were found in the *ter1-24* strain with catalytic activity (15 DEGs), binding capability (13 DEGs), and transporter activity (10 DEGs). Of the overexpressed genes in *ter1-02*, it was interesting to see that 41.05% (39) of those assigned in the status of “catalytic activity” have hydrolase activity, and 38.84% (35 genes) hold oxidoreductase activity; a similar enrichment of these two activities was found in the *ter1-24* DEGs reaching 31.31% (31 genes with hydrolase activity) and 38.83% (38 genes with oxidoreductase activity).

In the CC category of up-regulated genes, the most enriched DEGs of *ter1-02* mutant were intracellular anatomical structure (66 DEGs), organelle (49 DEGs), and cytoplasm (47 DEGs). In the *ter1-24* strain, the most enriched DEGs also were intracellular anatomical structure (81 DEGs), organelle (66 DEGs), and cytoplasm (64 DEGs). Likewise, in *ter1-24*, there were also downregulated DEGs in the same categories; the intracellular anatomical structure was enriched with a count of (13 DEGs), organelle (ten DEGs), and cytoplasm (nine DEGs). Finally, from the DEG analysis for the BP category in both mutants, the most abundant down-regulated genes included those from: the cellular process, metabolic process, localization, and response to stimuli. Agreeing with the above results, those DEGs were assigned to the catalytic activity group, genes that regulate molecular function, and union and transporter activity in the MF category. Interestingly, genes that regulate molecular function stood among the most enriched DEGs (26.54%) obtained from the analysis of both mutant strains. For the CC category, the main enriched DEGs were assigned to the intracellular anatomical structure group, and the number of DEGs assigned to the located in the membrane group increased, as well as those assigned to organelles and intrinsic components of membranes (Figure 5).

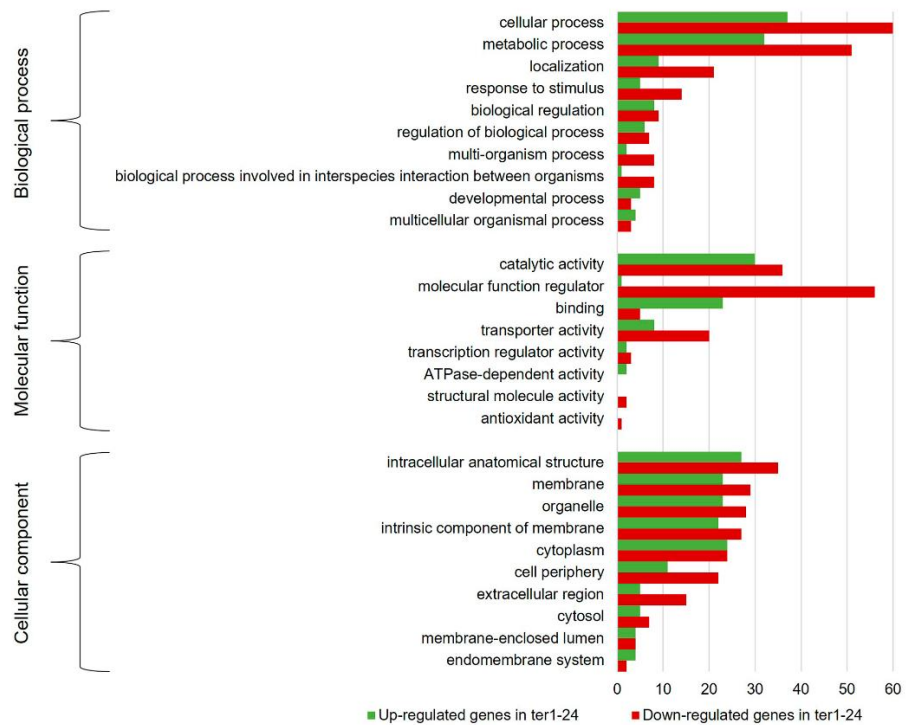


Figure 5. GO classification histogram of the DEGs identified in the differential expression analysis between both *ter1* mutants. The graph shows the ten most representative assignments for the categories biological process (level 2), molecular function (level 2) and cellular component (level 3).

3.4. Chromatin structure

Within the DEGs in *ter1-24*, we found that *UMAG_02709* was repressed, a *locus* which codes for histone H3.2; consistently, marked repression of the remaining components of the core histone complex [H2B (*UMAG_01505*), H2A (*UMAG_01504*), and H4 (*UMAG_02710*)] were also found with logFC values of -1.98, -1.93, and -1.74, respectively, in addition to the putative H1 (*UMAG_10447*) with logFC value -1.83. However, although repression of the same genes was observed in the *ter1-02* mutant, such changes were not significant at the cutoff point used, ranging between -0.93 (*UMAG_01504*) and -0.62 (*UMAG_10447*).

Additionally, in both mutants, there were no significant changes in the expression of H2A.Z (*UMAG_00469*) and H3.1 (*UMAG_03916*). Regarding other components involved in chromatin remodeling, in *ter1-24*, the changes were subtle, below the threshold in the genes *UMAG_02567* (logFC = -1.51) and *UMAG_06201* (logFC = -1.19) encoding for the catalytic subunit of histone acetyltransferase type B, and RuvB-like helicase 1 respectively. However, they need to be further explored.

3.5. Subtelomeric genes

Several isoforms of telomere-linked helicases (TLHs) have been identified in the genome of *U. maydis*, some of which are polymorphic segments of a predicted complete version(s) arranged in an interspersed mosaic at chromosome ends [45-47]. From a former group of reported RecQ-like sequences, UT5 (AF030886.2) and UT6 (AF030887.1) are included; from these, we found a short C-terminal segment of UT5 conserved in *UMAG_06476*, *UMAG_04094*, and *UMAG_04308* which along with *UMAG_06474*, *UMAG_11065*, showed a notable high expression in *ter1-02*, as shown in Table 1; on its own, *UMAG_06474* and *UMAG_11065* conserve a greater than 90% identity to UT6 (AF030887.1). On the other hand, *UMAG_12076*, which shares identity with the N-terminal end of UT5, was overexpressed only in *ter1-02*. Whereas the *UMAG_12032* locus, located at the right end of the chr 20 harbors an ORF that seems to be a novel second group of DEXH helicases sharing homology to TLH1 [18]; *UMAG_12032* was up-regulated in both mutant strains *ter1-02* (logFC = 3.16) and *ter1-24* (logFC = 5.20). Dereglulation of the TLHs in telomerase-negative strains is commonly correlated with the gene de-repression because of its location adjacent to the shortened telomere [45, 46, 48] (Figure S1 B).

Transcriptional expression of genes and non-coding sequences arranged on the 20 kb adjacent to each of the 46 chromosome termini of *U. maydis* was achieved to analyze the effect of *ter1*-disruption on them. That region contains 146 genes here sited. After analysis of DEGs in *ter1-02*, it was found that 30.13% of subtelomeric genes (18.25% of the total DEGs) were differentially expressed, while in *ter1-24*, 10.27% of subtelomeric genes were among DEGs (5.43% of DEGs), and from these only *UMAG_06259* (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D) was repressed. Only seven genes were overexpressed uniquely in *ter1-02* (*UMAG_05621*, *UMAG_11183*, *UMAG_06351*, *UMAG_11107*, *UMAG_04305*, *UMAG_10981*, *UMAG_04095*) with logFC greater than 2, without being classified as differentially expressed in *ter1-24* at the same cutoff point used. From the sets of DEGs located at the chromosomal ends, four belong to the core genes of the *ter1Δ* strains; among those, *UMAG_04695* encodes a choline transporter; *UMAG_06146* and *UMAG_12031* code for hypothetical proteins, and *UMAG_12032* encode an incomplete TLH1-like ATP-dependent DNA helicase.

In addition to the DEGs from subtelomeric regions (Figure S1), we found other DEGs sheltered in three of the four unmapped scaffolds (accession NW_011929455.1 to NW_011929458.1). Set on NW_011929455.1, the *UMAG_06490*, which encodes a predicted inorganic phosphate transporter, was differentially expressed in *ter1-24* (logFC = -2.21); in NW_011929456., the *UMAG_06503*, which encodes a DEG with similitude to the uncharacterized protein gene C1198.03c had a logFC = 2.88; finally, placed on NW_011929457.1, the loci *UMAG_06504* (encoding a protein of unknown function) and *UMAG_12076* (encoding a protein related to ATP-dependent DNA Q5/DEAD/DEAH box helicase) were up-regulated in *ter1-02*. The *UMAG_06504* fitted in the core of DEGs, and *UMAG_12076*, another RecQ-like helicase, was up-regulated in *ter1-02* with logFC = 4.93 but had no change in *ter1-24* (logFC = 0.22).

Table 1. Telomere-linked RecQ-like helicases are de-regulated in *ter1Δ* mutants. The DEGs obtained between the various comparisons are indicated in bold.

Gene id	Description	WT 518 vs. ter1-02	WT 518 vs. ter1-24	ter1-02 vs. ter1-24
<i>UMAG_12032</i> *	Related to ATP-dependent DNA helicase <i>tlh1</i>	3.161	5.206	2.067
<i>UMAG_12076</i> ^u	Related to ATP-dependent DNA helicase Q5	4.939	0.225	-4.688
<i>UMAG_06476</i> *	Related to RecQ helicase ^{1,2}	4.352	0.298	-4.028
<i>UMAG_06474</i> *	Related to RecQ helicase ^{1,2}	2.924	0.639	-2.259
<i>UMAG_11065</i> *	Related to RecQ helicase ^{1,2}	6.509	—	-9.438
<i>UMAG_04094</i> *	Related to RecQ helicase ^{1,2}	8.136	0.455	-7.651
<i>UMAG_04308</i> *	Related to RecQ helicase ^{1,2}	7.013	0.308	-6.679

1. [45]

2. [49]

*Located in subtelomeric region.

^uUnmapped scaffold

3.6. DEGs related to stress and DNA damage response (DDR)

Genes included in DEGs involved in stress- and DNA-damage responses are listed in Tables 2 and 3. Within the stress-response category, DEGs were mainly related to the oxidative stress response and cellular detoxification, excepting *UMAG_03122* (encoding a β -1,3-glucan-binding related protein), but is located within the first 20 kb of chromosomal ends. Most of these genes could be analogous to stress-induced responses and cellular senescence of *S. cerevisiae* [7]. The group also included the predicted genes implied in apoptosis *UMAG_01937*, *UMAG_02224* and *UMAG_03728*. In addition, *UMAG_04553* (predicted growth hormone-inducible transmembrane protein; logFC = 2.02) was differentially expressed in *ter1-24* because of a slight downregulation in *ter1-02*, whereas *UMAG_11483* (predicted protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase) and *UMAG_01262* (predicted β -DNA-polymerase) were uniquely up-regulated at logFC > 2 in *ter1-24* but induced in *ter1-02* at logFC = 1.15 and 1.83, respectively.

Table 2. Genes involved in response to environmental stress are de-regulated in *ter1Δ* mutants. The DEGs obtained between the various comparisons are indicated in bold.

Gene id	Description	WT 518 vs. ter1-02	WT 518 vs. ter1-24	ter1-02 vs. ter1-24
<i>UMAG_01758</i>	Related to multidrug resistance-associated protein 1	2.756	0.040	-2.692
<i>UMAG_01937</i>	Related to sphingomyelin phosphodiesterase	1.003	2.116	1.136
<i>UMAG_01965</i>	Related to solute carrier family 40 member 2	1.629	2.87	1.263
<i>UMAG_02224</i>	Related to palmitoyltransferase ZDHHC16	-1.678	1.149	2.851
<i>UMAG_02753</i>	Related to peroxygenase 2	5.517	—	-3.186
<i>UMAG_02803</i>	Related to beta-1,3-glucan-binding protein	7.852	—	-11.899
<i>UMAG_03073</i>	Related to glutathione S-transferase 3	1.176	2.027	0.881
<i>UMAG_03122</i> *	Related to beta-1,3-glucan-binding protein	2.118	0.938	-1.161

<i>UMAG_03177</i>	Related to peroxisomal membrane associated protein 20	2.293	2.788	0.519
<i>UMAG_03728</i>	Related to indoleamine 2,3-dioxygenase 1	-0.804	1.589	2.421
<i>UMAG_03881</i>	Related to 30 kDa heat shock protein	4.207	1.426	-2.755
<i>UMAG_04410</i>	Related to MFS siderochrome iron transporter C	-0.794	-4.970	-4.148
<i>UMAG_05600</i>	Related to succinate-semialdehyde dehydrogenase NADP(+)]	2.335	1.806	-0.503
<i>UMAG_06404</i>	Related to peroxiredoxin PRX1, mitochondrial	0.775	-1.938	-2.688
<i>UMAG_10131</i>	Related to phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 2	2.234	2.083	-0.127
<i>UMAG_10781</i>	Related to disulfide-bond oxidoreductase YfcG	3.518	2.097	-1.394
<i>UMAG_11944</i>	Related to glycerol 2-dehydrogenase (NADP(+))	1.495	-0.928	-2.399
<i>UMAG_12161</i>	Related to lipase 5	-0.163	-2.497	-2.305

*Located in subtelomeric region.

Among the DEGs in the DDR category (Table 3), the MutS4/Msh4 (*UMAG_12336*) and MutS5/Msh5 (*UMAG_12155*) homologs were annotated as members of the DEGs core genes (Figure 6); in yeast, those proteins are part of the ZMM group (Zip1-4, Msh4/Msh5, Mer3), which together with Mlh1 and Mlh3 promote crossover during meiotic recombination [50-52].

Table 3. DNA-damage response genes affected by *ter1Δ* mutation. The DEGs obtained between the various comparisons are indicated in bold.

Gene id	Description	WT 518 vs. <i>ter1-02</i>	WT 518 vs. <i>ter1-24</i>	<i>ter1-02</i> vs. <i>ter1-24</i>
<i>UMAG_12155</i>	Msh5 – MutS protein homolog 5 ²	2.426	3.797	1.398
<i>UMAG_12336</i>	Msh4 – MutS protein homolog 4 ²	3.674	2.454	-1.205
<i>UMAG_10845</i>	Related to G/U mismatch-specific DNA glycosylase	1.183	2.608	1.444
<i>UMAG_05917</i>	Related to cryptochrome DASH	1.200	2.370	1.199
<i>UMAG_01262</i>	Related to DNA polymerase beta	1.834	2.397	0.585
<i>UMAG_03290</i>	Rad51 – DNA repair protein RAD51 ¹	2.046	0.765	-1.256
<i>UMAG_11008</i>	Mer3 – ATP-dependent DNA helicase MER3 ²	2.011	2.427	0.432
<i>UMAG_04165</i>	Related to replication factor A protein 3	1.741	-0.387	-2.098
<i>UMAG_01952</i>	Related to UV-damage endonuclease	1.812	2.683	0.889
<i>UMAG_00172</i>	Related to meiotic recombination protein rec8	1.749	2.187	0.481

1. [53]

2. [54]

An increase in expression of Mer3 (*UMAG_11008*) homolog also occurred in both mutants (except for the NOISeq normalization value in *ter1-02*, logFC = 1.98; Table S5); Mlh3 (*UMAG_03481*) and Mlh1 homolog (*UMAG_05208*) were up-regulated more than 2-fold in

ter1-02. However, no such expression changes of *UMAG_05208* occur in ter1-24 (Table S5). In this last strain, upregulation occurred to a poor extent in *UMAG_10845* (predicted to encode thymine-DNA glycosylase; logFC = 1.18), *UMAG_05917* (predicted to encode deoxyribodipyrimidine photolyase; logFC = 1.20), and *UMAG_01262* (predicted to encode β -DNA polymerase; logFC = 1.8), which did not reach significance. Further study is now needed.

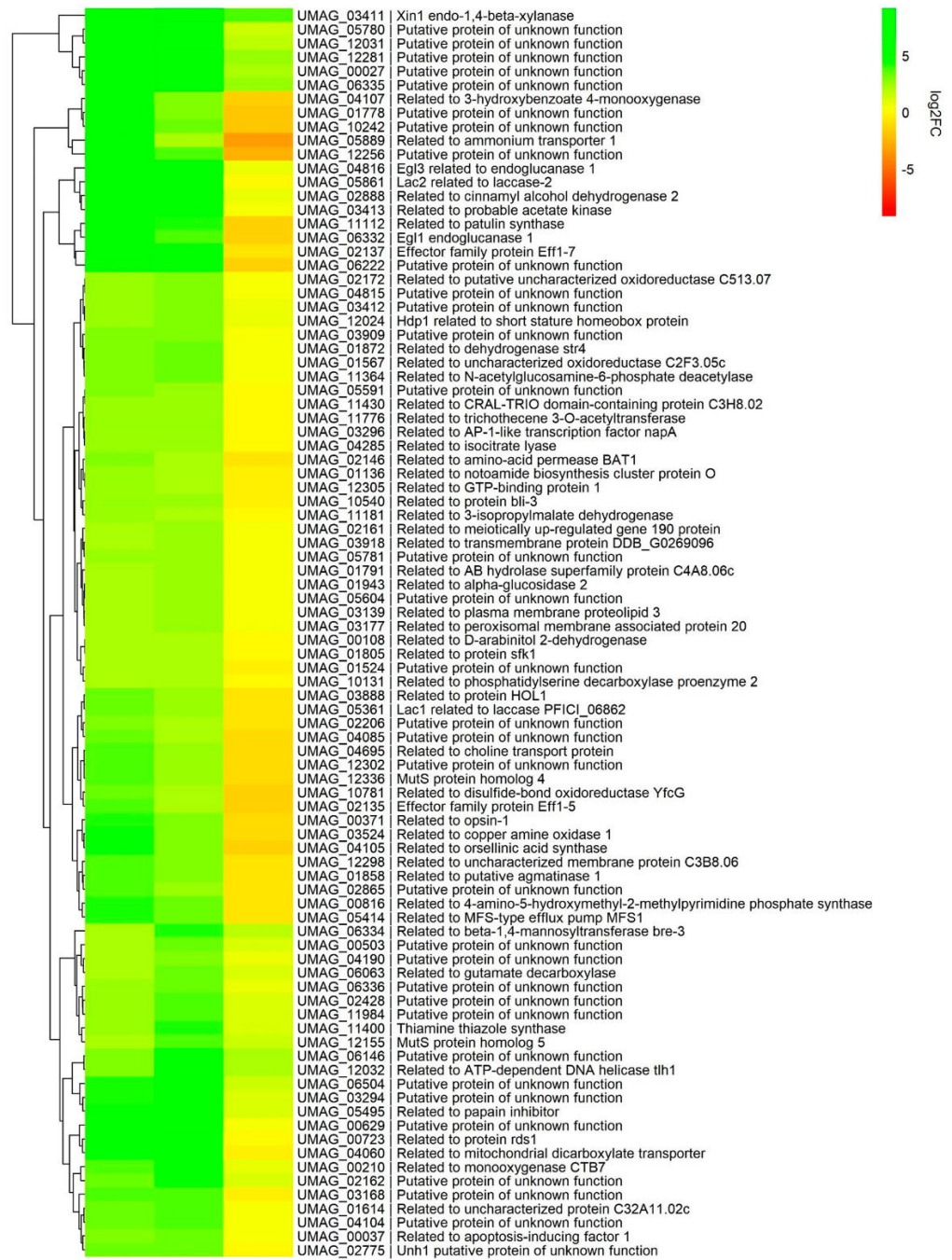


Figure 6. Heat map of the DEGs that make up the core of the *ter1::hph* mutants. The map was constructed with the log₂FC values obtained from the EdgeR analysis. Comparisons: WT vs. ter1-02 (first column), WT vs. ter1-24 (second column), ter1-02 vs. ter1-24 (third column).

Regarding the homologs of the yeast *RAD52* epistasis group in *U. maydis*, only *rad51* was differentially expressed ($\log_{2}FC \geq 2$) in the *ter1-02* strain, whereas in *ter1-24*, overexpression of the same gene reaches only a $\log_{2}FC = 0.76$. Also, we detected a slight upregulation of the genes encoding the RPA-heterotrimer: *RFA1* (*UMAG_05156*; $\log_{2}FC = 1.56$), *RFA2* (*UMAG_02579*; $\log_{2}FC = 1.50$) and *RFA3* (*UMAG_04165*; $\log_{2}FC = 1.74$).

Homologs of the *RAD3* epistasis group were differentially expressed in *U. maydis*: the putative *rad7* (*UMAG_00657*) showed an upregulation nearly 3 times in the *ter1-02* strain and nearly 2 times in *ter11-24* (Table S5), whereas the *rad16* homolog (*UMAG_03263*) did not exhibit expression changes. Finally, in *ter1-24*, the repression of some genes encoding DDR constituents at values above the $\log_{2}FC$ threshold of -2 was considered in this report because the interaction of their protein products with those of each other suggests alterations in DNA replication and/or repair among repressed DEGs are: PCNA (*UMAG_05403*, $\log_{2}FC = -1.18$), DNA pol ϵ catalytic subunit A (*UMAG_01008*, $\log_{2}FC = -1.56$), DNA ligase1 (*UMAG_11196*, $\log_{2}FC = -1.05$), regarding components of the heteropentameric RFC homologs in *U. maydis*, putative RFC5 (*UMAG_00920*) were downregulated marginally by $\log_{2}FC = -1.45$; RFC4 (*UMAG_00729*) had a $\log_{2}FC = -1.05$, MCM10 (*UMAG_10135*) had a $\log_{2}FC = -1.25$. On the other hand, the putative mcm2-7 complex exhibited $\log_{2}FC$ values between -0.62 and -1.01, except MCM5 (*UMAG_05064*) $\log_{2}FC = -0.10$, which could also be considered ambiguous values. Finally, the genes encoding the homologous subunits of the DNA-directed RNA polymerase II complex were slightly downregulated as follows: RPB11 (*UMAG_02324*; $\log_{2}FC = -1.83$), RPABC1 (*UMAG_10512*; $\log_{2}FC = -1.25$), RPABC2 (*UMAG_10433*; $\log_{2}FC = -1.01$) and RPABC3 (*UMAG_04460*; $\log_{2}FC = -1.15$) (Table S5), and its role in the telomerase-deletion response need to be aborbed by alternative strategies.

3.7. Genes involved in telomere maintenance

3.7.1. Shelterin-, CST-, and MRX/MRN complexes

Except for *Tpp1*, which showed near to 50% repression in the *ter1-24* mutant, no significant changes were found in the expression of genes encoding the components of the shelterin complex (*Trf1*, *UMAG_02326*; *Rap1*, *UMAG_04676*; *Tpp1*, *UMAG_11538*; *Pot1*, *UMAG_05117*) [24, 26], CST complex (*Stn1*, *UMAG_11687*; *Ten1*, *UMAG_11842*) [24], or the MRX/MRN complex (*Mre11*, *UMAG_04704*; *Rad50*, *UMAG_01085*) [26].

3.7.2. Putative SM7-like subunits

A highly conserved motif has been found at the 3' end of the putative TER of all the members of Ustilaginales studied by Sanpedro-Luna et al. 2023, which share homology with the binding site for Sm7. This finding, which suggests the requirement of an SM7-like complex for telomerase biogenesis, prompted us to search the Ustilaginales' genes encoding the protein homologs of the B/B', D1, D2, D3, E, F, and G and analyze their expression changes in the *ter1 Δ* mutants of *U. maydis*. From those putative homologs of SM7 genes, the SMD1 (*UMAG_10381*, $\log_{2}FC = -1.57$), SMD2 (*UMAG_04781*, $\log_{2}FC = -1.26$), SMD3 (*UMAG_11043*, $\log_{2}FC = -1.20$) were slightly downregulated; a marginal change in was found for SMB (*UMAG_12244*, $\log_{2}FC = -0.75$), but no expression changes were found for SME (*UMAG_10312*), SMF (*UMAG_12130*) and SMG (*UMAG_10805*) in the *ter1-24* mutant. The same strain also showed a slight downregulation (i.e., $\log_{2}FC < 2.0$) of components of the predicted Dyskerin complex: Dyskerin/CBF5 (*UMAG_00685*, $\log_{2}FC = -1.18$), NPH2 (*UMAG_03340*, $\log_{2}FC = -1.61$), GAR1 (*UMAG_04573*, $\log_{2}FC = -1.03$) and NAF1 (*UMAG_03271*, $\log_{2}FC = -0.87$); no expression changes are predicted for NOP10 (*UMAG_03354*).

3.7.3. Telomere-linked helicases (TLH1-like)

As noted above, the participation of middle repeated elements *UTASa* and *UTASb* harbor ORFs encoding for helicase-like sequences whose participation in telomere maintenance has been proposed by some authors [18, 48]. In both the *ter1-02* and *ter1-24* mutant strains, the *UMAG_12032* locus was up-regulated; this could be associated with a possible gene de-repression of subtelomeric sequences after telomere-repeats loss or a possible role of this RecQ-like helicase in the primary DNA metabolism in the absence of telomerase [18, 45, 46, 48] (Figure S1 B). Interestingly, the expression of *UMAG_12032* in *ter1-24* is sufficiently high compared to *ter1-02* to be considered as a DEG (logFC = 2.06) from one to the other and is the only helicase-related gene overexpressed in this strain in contrast to the seven genes observed in *ter1-02* (Table 2). The upsurge in transcriptional expression of such genes in *U. maydis* needs to be surveyed to determine if they play a role in the formation of survivors or if their activity could be dispensable.

3.8. Genes involved in cell cycle progression and pathogenic development

The dimorphic fungus *U. maydis* requires *planta* development to complete its life cycle. To achieve this, it experiences a morphologic and metabolic transition from saprophytic sporidia (yeast-like) to pathogenic mycelium (hyphae); this lifestyle change requires the reprogramming of gene expression [45, 55, 56]. Genes engaged in controlling the cell cycle and the fungal growth within the plant tissues, as well as genes encoding effectors required to subdue the plant response, are critical to complete the life cycle of this obligated fungal pathogen: The loss of key genes involved in the development or maintenance of the pathogenic lifestyle could cause growth distress and impairment to complete the life cycle [45, 57, 58].

3.8.1. The cell cycle progression.

In the *ter1Δ* mutants, there were no expression changes detected in the master regulator *cdk1*, nor in the *cdk5* involved in cell differentiation [59, 60], yet Cdk5-related cyclin-partner *pcl12* [61] reached the DEG threshold only in *ter1-24*; the same gene had a logFC = 0.86 in *ter1-02* (Table 4).

Table 4. The life cycle and pathogenic development genes are de-regulated in response to the *ter1Δ* mutation. The DEGs obtained between the various comparisons are indicated in bold.

Gene id	Description	WT 518 vs. ter1-02	WT 518 vs. ter1-24	ter1-02 vs. ter1-24
<i>UMAG_10529</i>	Pcl12—related to PHO85 cyclin-2 ¹⁰	0.860	3.388	2.535
<i>UMAG_00628</i>	Putative protein of unknown function ⁸	5.109	—	-1.462
<i>UMAG_00876</i>	Related to glucan 1,3-beta-glucosidase ¹	0.900	-1.435	-2.31
<i>UMAG_01130</i>	Related to tyrosinase ustQ ⁷	-0.164	2.628	2.801
<i>UMAG_01237</i>	Putative protein of unknown function, cluster 2A ¹	5.519	—	-5.015
<i>UMAG_01238</i>	Putative protein of unknown function, cluster 2A ¹	6.249	—	-5.815
<i>UMAG_01431</i>	Fer6—multidrug resistance protein fer6 ²	-1.163	-3.861	-2.674
<i>UMAG_01432</i>	Fer5—acyltransferase fer5 ²	-0.767	-3.711	-2.92
<i>UMAG_01433</i>	Fer4—enoyl-CoA isomerase/hydratase fer4 ²	-0.613	-6.571	-5.924
<i>UMAG_01690</i>	Putative protein of unknown function ⁷	3.949	—	-2.207

<i>UMAG_01695</i>	Stp6—Putative protein of unknown function ¹⁰	—	5.615	0.842
<i>UMAG_01788</i>	Related to chitin deacetylase ³	1.022	-2.465	-3.476
<i>UMAG_01829</i>	Related to alpha-L-arabinofuranosidase A ¹	2.673	1.529	-1.126
<i>UMAG_01888</i>	Probable serine carboxypeptidase, cluster 3A ¹	0.532	2.143	1.633
<i>UMAG_01945</i>	Putative invertase ³	2.373	4.817	2.465
<i>UMAG_02135</i>	Effector family protein Eff1-5 ⁶	3.740	2.215	-1.498
<i>UMAG_02136</i>	Effector family protein Eff1-6 ⁶	7.088	—	-1.341
<i>UMAG_02137</i>	Effector family protein Eff1-7 ⁶	5.394	4.716	-0.649
<i>UMAG_02138</i>	Effector family protein Eff1-8 ⁶	3.099	2.239	-0.820
<i>UMAG_02140</i>	Effector family protein Eff1-10 ⁶	2.426	2.692	0.301
<i>UMAG_02758</i>	Putative protein of unknown function ³	-0.473	-2.133	-1.632
<i>UMAG_03023</i>	Related to ribonuclease T2-like 1-A ³	-0.653	-4.881	-4.193
<i>UMAG_03382*</i>	Related to 3-phytase A ³	1.305	2.814	1.534
<i>UMAG_03411</i>	Xin1—endo-1,4-beta-xylanase ¹	5.562	9.175	3.65
<i>UMAG_03416</i>	Putative protein of unknown function ¹	2.482	2.625	0.160
<i>UMAG_03749</i>	Putative protein of unknown function, cluster 10A ¹	1.944	2.601	0.700
<i>UMAG_03750</i>	Putative protein of unknown function, cluster 10A ¹	—	4.125	2.386
<i>UMAG_03751</i>	Putative protein of unknown function, cluster 10A ¹	5.598	3.721	-1.824
<i>UMAG_04282</i>	Related to 3-phytase A ³	1.336	3.869	2.556
<i>UMAG_04309</i>	Probable alpha-L-arabinofuranosidase ¹	4.469	0.820	-3.625
<i>UMAG_04364</i>	Related to glucan 1,3-beta-glucosidase ¹	2.904	2.711	-0.162
<i>UMAG_04503</i>	Probable alpha-galactosidase D ¹	4.467	—	-3.390
<i>UMAG_04816</i>	Egl3—Related to endoglucanase 1 ^{1,5}	5.717	6.415	0.698
<i>UMAG_05036</i>	Related to probable glycosidase C21B10.07 ³	0.744	3.080	2.360
<i>UMAG_05299</i>	Putative protein of unknown function, cluster 19A ¹	0.756	2.789	2.067
<i>UMAG_05306</i>	Putative protein of unknown function, cluster 19A ¹	4.330	—	-1.603
<i>UMAG_05308</i>	Putative protein of unknown function, cluster 19A ¹	2.876	—	-2.949
<i>UMAG_05310</i>	Putative protein of unknown function, cluster 19A ¹	7.574	—	-9.239
<i>UMAG_05314</i>	Putative protein of unknown function, cluster 19A ¹	3.579	—	-3.060
<i>UMAG_05361</i>	Lac1—laccase ^{3,4}	3.437	2.576	-0.836
<i>UMAG_05439</i>	Related to GlcNAc-binding protein A ⁷	3.655	-0.031	-3.665
<i>UMAG_05495</i>	Related to papain inhibitor ⁷	4.355	5.372	1.037
<i>UMAG_05689</i>	Related to Fe-regulated protein 8 ²	2.425	1.702	-0.700
<i>UMAG_05861</i>	Lac2—laccase-2 ^{3,4}	5.316	5.355	0.064
<i>UMAG_06190</i>	Related to chitinase A1 ³	3.479	—	-1.840

UMAG_06221	Putative protein of unknown function, cluster 22A ¹	2.243	1.030	-1.183
UMAG_06222	Putative protein of unknown function, cluster 22A ¹	6.296	4.759	-1.521
UMAG_06274	Related to hormone-sensitive lipase ³	1.259	3.221	1.985
UMAG_06332	Egl1—endoglucanase 1 ^{1,5}	5.283	3.747	-1.518
UMAG_10055	Related to glutathione hydrolase proenzyme ³	3.490	—	-2.091
UMAG_10557	Putative protein of unknown function, cluster 19A ¹	4.454	—	-3.768
UMAG_11338	Fer8—Fe-regulated protein 8 ²	0.141	-2.720	-2.833
UMAG_11339	Fer7—siderophore transporter fer7 ²	-1.095	-4.791	-3.672
UMAG_12330	Putative protein of unknown function ³	1.550	3.223	1.701
UMAG_05528	Related to alkali-sensitive linkage protein 1 ⁹	5.131	—	-4.945
UMAG_02161	Related to meiotically up-regulated gene 190 protein	2.322	2.503	0.205
UMAG_02517	Gpa2—guanine nucleotide-binding protein alpha-2 subunit	1.110	2.444	1.360
UMAG_02994	Related to sporulation-specific protein 5	-0.065	2.505	2.591
UMAG_03541	Related to meiotic expression up-regulated protein 26	4.233	—	-0.999
UMAG_05467	Related to meiotic coiled-coil protein 2	5.627	—	-3.148
UMAG_11677	Related to serine/threonine-protein kinase cek1	0.837	2.533	1.720

1. [45].

2. [62].

3. [63].

4. [64].

5. [65].

6. [66].

7. [67].

8. [68].

9. [69].

10. [61].

*Located in subtelomeric region.

It has been reported that the *pcl12* gene is controlled by the bE/bW heterodimer [70], and several other genes have been implicated in pathogenic development, suggesting an unknown connection between chromosome maintenance and the developmental process in this dimorphic fungus. The analysis also detected in *ter1-24* mutant the downregulation of Rad21 (logFC = -1.21), Smc1 (logFC = -1.15), and Smc3 (logFC = -0.94) to nearly half of its normal expression, suggesting a failure of chromosome condensation could occur in the *ter1Δ* mutants; that observation was consistent with an increase in the number of cells from the *ter1Δ* mutants exhibiting alterations in cell morphology and nuclear aberrations as was previously reported [28] and was similar with cases reported in fission yeast and other Rad21 deficient cell lines such as MEFs and LCLs [71-73]. In the *ter1Δ* mutants of *U. maydis*, the chromosome aberrations need to be tackled specifically, as in *ter1-02*, the possible micronuclei formation appears, and in *ter1-24* prevails the shapes resembling nuclei hyperelongation [28].

Slight upregulations of *chk1* (logFC = 1.40) and *wee1* (logFC = 1.18) were also observed in *ter1-02* and *ter1-24*, respectively, but were below the threshold logFCs= 2.0; however, no expression changes were found in the predicted apical kinase *atr1* in neither of both mutants (logFC = 0.51 and 0.49). The expression changes of controllers of the cell cycle in sporidia were possibly unlinked to changes in the DNA repair system at apical response [74].

Since the third portion of the DEGs in mutant strains lacks an assigned function or a defined role, a database of genes involved in pathogenic development was constructed, which included fungal secreted proteins, cell wall degrading enzymes, plant component degrading enzymes, and proteins involved in the organization of the fungal cell wall was constructed to further learn about the influence of chromosome architecture and fungal development [45, 63, 67, 69, 75].

3.8.2. The pathogenic development

About 10% of the DEGs were involved in pathogenic development in both mutants. Those genes were included in the group of core genes and included some encoding plant cell-wall degrading enzymes as *egl1* and *egl3* endoglucanases; *xin1* endoxylanase, which is engaged in the fungal cell-wall organization, and *lac1* and *lac2* involved in melanin synthesis [64, 65].

Particular gene clusters, which are collectively controlled, were up-regulated in both mutants, i.e., the genes encoding the Eff1 protein family (except for *eff1*) located on the chr 5; those genes whose products have a role in virulence were up-regulated [45, 66] (Table 4), possibly, the lack of telomerase could cause deregulation of these genes through the modification of the expression pattern of key controllers of pathogenicity. Remarkably, except for *fer3*, the downregulation of the *fer* gene cluster, located on the telomere-proximal right end of the chr 2, also occurred in *ter1-24* strain of *U. maydis* (Figure 7A), being *fer9*, *fer10* and *fer11* the most telomere-proximal genes [62].

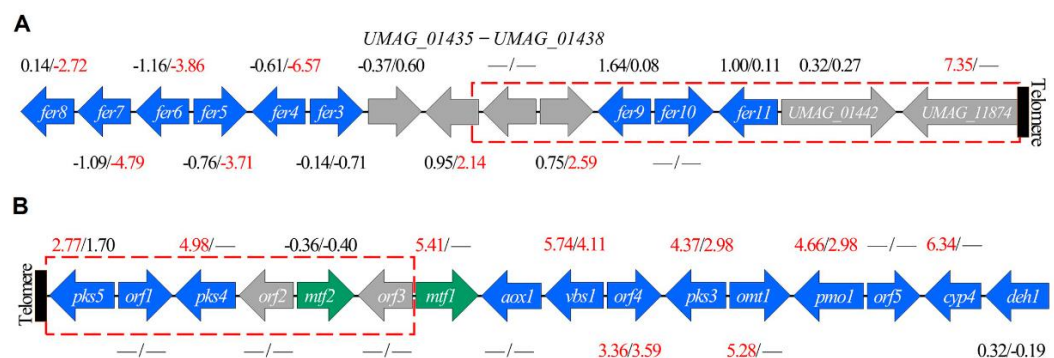


Figure 7. *ter1*-disruption causes the deregulation of gene clusters involved in pathogenic development. (A) Schematic representation of the iron uptake cluster. (B) Schematic representation of the PKS cluster (Adapted from Reyes-Fernandez et al. 2021). Arrows indicate the direction of gene transcription but not gene sizes. Red rectangles represent the first 20 kb of the chromosomal end. Blue arrows represent genes that are part of the cluster. Gray arrows represent genes that do not belong to the cluster's co-regulated genes. Green arrows represent transcriptional factors. The logFC values obtained from the differential expression analysis with EdgeR are shown. Values on the left correspond to those of strain *ter1-02*. Values on the right correspond to those of strain *ter1-24*. DEGs are represented in red.

Both the *fer* cluster as well as the *sid1*, *sid2*, *fer1*, and *fer2* genes are negatively regulated by the Urbs1 factor [62, 77], but neither *urbs1* nor its target genes outside the *fer* cluster were downregulated, suggesting the chromatin relaxation in the subtelomeric region could ease the interaction of *urbs1* or with other negative regulators with the *fer*-cluster promoters.

Moreover, the *UMAG_01436* (related to acetyltransferase MAT1) and *UMAG_01438* (predicted Acyl-CoA-dependent acyltransferase gene) *loci*, which separate *fer9-11* from the remaining genes of the *fer* cluster, were up-regulated in *ter1-24*; whereas strong upregulation ($\log_{FC} = 7.35$) of the *UMAG_11874* gene, encoding a hypothetical protein of unknown function was detected *ter1-02*. Again, *UMAG_11874* is the last gene at the end of chromosome 2 (Figure 7A).

Other DEGs encoding proteins of unknown function located within clusters 2A, 10A, 19A, and 22A [45] were de-regulated in one or both mutants (Table 3). Finally, the genes involved in the evasion of the immune response and release of plant nutrients, such as phytases (*UMAG_03382*, *UMAG_04282*), lipases (*UMAG_06274*), and proteases (*UMAG_12330*) [63], were identified as DEGs in *ter1-24*; meanwhile, the *ter1-02* showed slight increases ($\log_{FC} > 1 < 2$).

3.9. Differentially expressed transcription factors

The DEGs encoding transcriptional factors (TFs) are listed in Table 5. Among the set TFs-genes altered in the *ter1Δ* mutants, a number of those associated with pathogenic development were found, such as *hdp1*, which was found differentially expressed in both the *ter1-02* and *ter1-24* mutant strains. The *hdp1* is required for filamentous growth and cell cycle arrest [78]; likewise, *hdp2* (*UMAG_04928*), which plays a role in appressorium formation [65], was upregulation (below the threshold of 2) in both mutant strains ($\log_{FC} = 1.61$ in *ter1-02* and 1.81 *ter1-24*). The *fox1* gene, involved in the suppression of plant defenses [79], was highly overexpressed only in *ter1-02* ($\log_{FC} = 4.98$). The three TFs (*hdp1*, *hdp2* and *fox1*) are activated by the Rbf1 master regulator (*UMAG_03172*), which in turn is activated by the bE/bW heterodimer in a dependent manner and also participates in the activation of *biz1* and MAP kinase Kpp6, which are involved in appressorium formation [65, 80].

Table 5. Transcription factors are de-regulated in response to *ter1* mutation. The DEGs obtained between the various comparisons are indicated in bold.

Gene id	Description	WT 518 vs. ter1-02	WT 518 vs. ter1-24	ter1-02 vs. ter1-24
<i>UMAG_01025</i>	Related to probable transcriptional regulatory protein STB4	2.953	2.462	-0.429
<i>UMAG_01456</i>	Related to regulatory protein CAT8 ³	0.758	2.057	1.323
<i>UMAG_01523</i>	Fox1 – related to fork head domain transcription factor slp1 ¹	4.985	–	-3.212
<i>UMAG_02835</i>	Related to conidiophore development regulator abaA ³	-0.008	2.615	2.650
<i>UMAG_03296</i>	Related to AP-1-like transcription factor napA	2.751	2.691	-0.026
<i>UMAG_04101</i> *	Mtf1 – related to Myb-related protein A ²	5.413	–	-3.400
<i>UMAG_04778</i>	Related to transcriptional repressor XBP1 ³	–	3.538	1.560
<i>UMAG_05721</i>	Srb1 – related to putative transcription factor sre2 ^{3,4}	-1.494	1.386	2.904
<i>UMAG_06308</i>	Related to transcription factor RFX4 ³	0.727	2.138	1.432
<i>UMAG_12024</i>	Hdp1 – related to short stature homeobox protein ⁵	2.476	3.108	0.647

<i>UMAG_12304</i>	Related to positive regulator of purine utilization	4.330	0.912	-3.390
<i>UMAG_03172</i>	Rbf1 – Related to Zinc finger protein 2 ⁶	0.803	2.041	1.249
<i>UMAG_02775</i>	Unh1 ⁷	3.315	3.281	-0.011

1. [79].
2. [76].
3. [81].
4. [82].
5. [78].
6. [80].
7. [64].

*Located in subtelomeric region.

Also, *kpp6* was identified as differentially expressed in *ter1-24*, as was the *rbf1*. Those results in sporidia, which lack the functional bE/bW heterodimer because they are haploid cells, together with the absence of deregulation, or with a slight increase in *ter1-24*, in the expression of factors upstream of Pfr1 suggest that other unidentified components or possibly TER1 could be involved in the regulation of *rbf1*, and hence some of the target genes of Rbf1 (Figure 8) as occurs when the fungus behaves as a necrotrophic pathogen [70]. Other DEGs which encode transcription factors that are shared by the *ter1Δ* mutants as core genes were: the homolog of bZip (*UMAG_03296*) from the AP-1 family, involved in response to oxidative stress and plant-host interaction [83, 84], and *unh1*, the TF required for formation and pigmentation of teliospores, and completion of meiosis [64]. Intriguingly, none of its five target genes (*UMAG_00983*, *UMAG_06485*, *UMAG_04827*, *UMAG_05664*, *UMAG_11505*) were de-regulated in either mutant, suggesting the cooperation of other unidentified factors in the regulation of these genes.

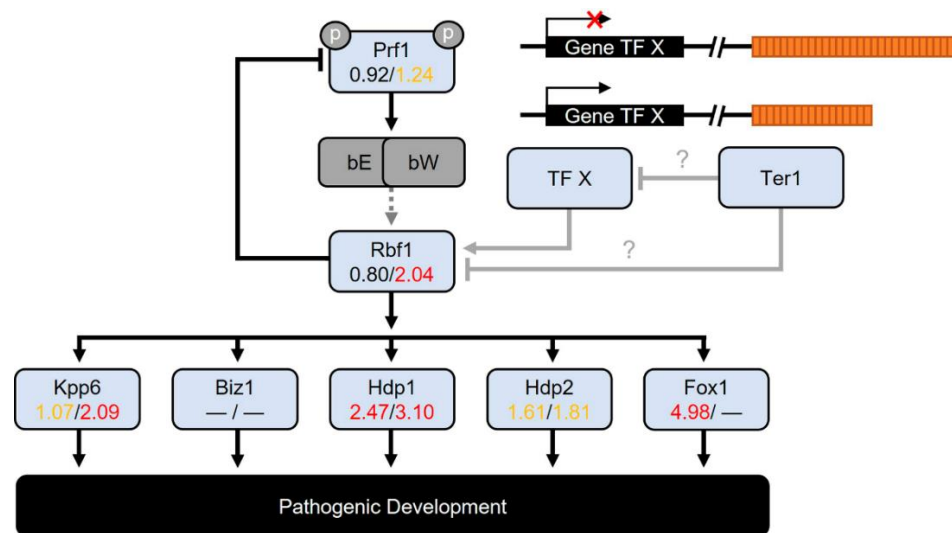


Figure 8. Rbf1 pathway expression is altered in *ter1::hph* mutants. Schematic diagram of the response cascade controlled by the master regulator Rbf1. The logFC values were obtained using the EdgeR analysis, shown below each gene. Values on the left correspond to the *ter1-02* strain. Values on the right correspond to the *ter1-24* strain. DEGs are represented in red. Genes with an increase in transcriptional expression greater than two-fold are in yellow. *ter1-24* shows a significant increase in the expression of Rbf1, independent bW_x/bE_y heterodimer formation; an increase in mainly the expression of Rbf1-target genes is observed in *ter1-02*. It is tempting to suggest that due to losing TPE as the telomere shortens, an unidentified TF up-regulated its expression. That TF may then have up-regulated Rbf1 and promoted the expression of genes located downstream of the regulatory cascade. Alternatively, Ter1 could be the negative regulator of Rbf1 or the unidentified TF.

Among the TFs up-regulated solely in the *ter1-24* mutant were: *UMAG_01456*, *UMAG_06308*, *UMAG_02835*, and *UMAG_04778*, which in natural circumstances are up-regulated during pathogenic development [81, 85, 86], and *UMAG_01025*, which is progressively repressed during early infection and responds to unfolded proteins [81, 82]. Whereas in the same TFs category, the DEGs identified only in the *ter1-02* were the *UMAG_12304* and *UMAG_04101* that encode Mtf1, a transcription regulator of the gene cluster located at the end of chromosome 12 involved in melanin production [76, 87]; consistently, its target genes (*pks5*, *pks4*, *vbs1*, *orf4*, *pks3*, *omt1*, *pmo1*, and *cyp4*) were also identified as DEGs, while *orf1*, *orf5*, *aox1* and *deh1* do not exhibit changes in transcriptional expression, nor *mtf2* or its target *orf2* (Table S5).

Although no information about the expression of *mtf1* in *ter1-24* was registered, upregulation of *vbs1*, *orf4*, *pks3*, and *pmo1* supported our notion that a weak upregulation of *mtf1* occurred in this mutant, as it was hinted in the analysis of gene expression between both mutants (Table 5). Alternatively, telomere loss could have alleviated the silencing of the subtelomeric gene cluster in *ter1-24* (Figure 7B). Another insight was the induction of *pks1*, *pks2*, and *lac1* expression seen in *ter1-02*, but solely of *lac1* in *ter1-24* mutant; those three genes play principal roles in teliospores melanization [88]; paradoxically, expression of *ust1* – the TF regulator of *pks1*, *pks2* and *lac1* – remained unchanged in both mutants.

3.10. Absence of TER alters biotrophic phase genes independently of telomere erosion

There is growing knowledge about the non-telomeric functions of the core components of telomerase. Studies carried out in various organisms, and cell lineages have been focused mainly on TERT (reviewed in [89, 90]). However, contributions to the knowledge of telomeric and non-telomeric TER functions are emerging. As a result, it has been described that the TER component participates in response to DNA damage [91], protection against oxidative stress in motor neuron cells [92], regulation of apoptosis probably through the promotion of cell survival mediated by hTERP, an intra-TER gene that codes for a 121 aa protein involved in the processing of autophagy [93, 94]; regulation of gene expression and cell differentiation [95-98]. A correlation between telomerase proficiency and teliospore formation was previously reported [23]; recently, the finding of an asymmetric effect on teliospore formation upon *trt1-* or *ter1-*disruption was reported [28]. In their experiments, *ter1Δ* mutants could not cause tumor galls in heterozygous crosses with wild-type strains, as did the *trt1Δ* mutants. Questions arise as to whether the telomerase subunits genes could be regulated differently during the dimorphic transition in this fungus, as occur with the telomerase catalytic subunit in metazoans, and whether the core genes are regulated through additional telomerase-independent activities in *U. maydis*; in either case, these questions need to be addressed experimentally. The results supporting the telomerase deregulation upon dimorphic transition come from [81], which found slight changes in TERT expression during sporidia to mycelia development, and transcriptional repression of *UMAG_03168* during the early stage of biotrophic development; that gene encodes the 5' end of the bicistronic *ter1* transcript [25, 28].

Moreover, deregulation of the non-telomeric genes encoding Rbf1 and Unh1, which controls the pathogenic development of *U. maydis*, occurred after *ter1*-disruption and could, in turn, obstruct the completion of the life cycle of the mutants in different ways. Phenotypic variation due to *ter1Δ* mutation in the here studied strains could be attributed to changes in the chromosome-end dynamics due to the adjustment of epigenetic marks on telomere-associated sequences and genes adjacent to them; those adjustments could result from the overamplification of the telomere repeats and TAS, which in turn are caused by the surviving recombinational mechanisms.

Variegated gene expression may, ultimately, modify the transcriptional regulation cascade to obtain results, such as that of *UMAG_05721*, a gene encoding for the *srbA* homolog *srb1* from *U. maydis*, which is involved in hypoxia adaptation and was proposed co-regulator of tumor formation [81]. That gene was repressed in the *ter1-02* strain; yet, in *ter1-24*, *srb1* is up-regulated (Table 4). In cases when deregulation is driven in the same sense (up or low) in both mutants, disparities in differential expression would be smaller using as threshold a $\log_{2}FC = 1$. Moreover, the production of similar percentages of symptoms in the infection assays with both mutants [28] suggests a central group of genes (core genes) is associated with controlling early stages of biotrophic development and constitute the echo of penetrance of *ter* Δ mutations.

4. Conclusions

The absence of the RNA component of telomerase in *U. maydis* triggers upregulation of genes involved in ALT, environmental stress response, and pathogenesis. Shortening telomeres and loss of telomere position effect (TPE) could explain ALT and ESR, but the upregulation of genes outside sub-telomeric regions needs to be further explored. This work indicates Ter1 plays a role during the dimorphic transition, and there may be a negative controller relationship between Ter1 and the master regulator Rbf1 or other factors modulating its function. Comparing the transcriptomes of *ter1* Δ and *trt1* Δ mutants could provide more insight into possible non-telomeric roles of core telomerase subunits and of genes proximal to the *ter1*, such as *UMAG_03168*, *UMAG_03169*, and *rbf1*.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Transcriptional landscape of chromosomal ends of *U. maydis*; Table S2: DEGs identified in *ter1-02* with respect to the wild-type strain; Table S3: DEGs identified in *ter1-24* with respect to the wild-type strain; Table S4: DEGs identified in *ter1-24* with respect to the *ter1-02* mutant; Table S5: Counting tables obtained with DESeq2, EdgeR, Limma-Voom and NOISeq.

References

1. Pfeiffer, V.; Lingner, J. Replication of Telomeres and the Regulation of Telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a010405.
2. Lundblad, V. The End Replication Problem: More Than One Solution. *Nat Med* **1997**, *3*, 1198-1199.
3. Blackburn, E.H.; Collins, K. Telomerase: An Rnp Enzyme Synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2011**, *3*,
4. Flores, I.; Benetti, R.; Blasco, M.A. Telomerase Regulation and Stem Cell Behaviour. *Curr Opin Cell Biol* **2006**, *18*, 254-260.
5. Flores, I.; Canela, A.; Vera, E.; Tejera, A.; Cotsarelis, G.; Blasco, M.A. The Longest Telomeres: A General Signature of Adult Stem Cell Compartments. *Genes Dev* **2008**, *22*, 654-667.
6. Kim, N.W.; Piatyszek, M.A.; Prowse, K.R.; Harley, C.B.; West, M.D.; Ho, P.L.; Coviello, G.M.; Wright, W.E.; Weinrich, S.L.; Shay, J.W. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* **1994**, *266*, 2011-2015.
7. Taggart, A.K.; Teng, S.C.; Zakian, V.A. Est1p as a Cell Cycle-Regulated Activator of Telomere-Bound Telomerase. *Science* **2002**, *297*, 1023-1026.
8. Mozdy, A.D.; Cech, T.R. Low Abundance of Telomerase in Yeast: Implications for Telomerase Haploinsufficiency. *RNA* **2006**, *12*, 1721-1737.
9. Dionne, I.; Larose, S.; Dandjinou, A.T.; Abou Elela, S.; Wellinger, R.J. Cell Cycle-Dependent Transcription Factors Control the Expression of Yeast Telomerase Rna. *RNA* **2013**, *19*, 992-1002.

10. Singer, M.S.; Gottschling, D.E. Tlc1: Template Rna Component of Saccharomyces Cerevisiae Telomerase. *Science* **1994**, *266*, 404-409.
11. Ijpmma, A.; Greider, C.W. Short Telomeres Induce a DNA Damage Response in Saccharomyces Cerevisiae. *Mol Biol Cell* **2003**, *14*, 987-1001.
12. Lundblad, V.; Blackburn, E.H. An Alternative Pathway for Yeast Telomere Maintenance Rescues Est7- Senescence. *Cell* **1993**, *73*, 347-360.
13. Teng, S.C.; Zakian, V.A. Telomere-Telomere Recombination Is an Efficient Bypass Pathway for Telomere Maintenance in Saccharomyces Cerevisiae. *Mol Cell Biol* **1999**, *19*, 8083-8093.
14. Makovets, S.; Williams, T.L.; Blackburn, E.H. The Telotype Defines the Telomere State in Saccharomyces Cerevisiae and Is Inherited as a Dominant Non-Mendelian Characteristic in Cells Lacking Telomerase. *Genetics* **2008**, *178*, 245-257.
15. Hu, Y.; Tang, H.B.; Liu, N.N.; Tong, X.J.; Dang, W.; Duan, Y.M.; Fu, X.H.; Zhang, Y.; Peng, J.; Meng, F.L.; Zhou, J.Q. Telomerase-Null Survivor Screening Identifies Novel Telomere Recombination Regulators. *PLoS Genet* **2013**, *9*, e1003208.
16. Teng, S.C.; Epstein, C.; Tsai, Y.L.; Cheng, H.W.; Chen, H.L.; Lin, J.J. Induction of Global Stress Response in Saccharomyces Cerevisiae Cells Lacking Telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *291*, 714-721.
17. Nautiyal, S.; DeRisi, J.L.; Blackburn, E.H. The Genome-Wide Expression Response to Telomerase Deletion in Saccharomyces Cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 9316-9321.
18. Mandell, J.G.; Goodrich, K.J.; Bahler, J.; Cech, T.R. Expression of a Recq Helicase Homolog Affects Progression through Crisis in Fission Yeast Lacking Telomerase. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 5249-5257.
19. Beletsky, A.V.; Malyavko, A.N.; Sukhanova, M.V.; Mardanova, E.S.; Zvereva, M.I.; Petrova, O.A.; Parfenova, Y.Y.; Rubtsova, M.P.; Mardanov, A.V.; Lavrik, O.I.; Dontsova, O.A.; Ravin, N.V. The Genome-Wide Transcription Response to Telomerase Deficiency in the Thermotolerant Yeast Hansenula Polymorpha D1-1. *BMC Genomics* **2017**, *18*, 492.
20. Cervenak, F.; Jurikova, K.; Devillers, H.; Kaffe, B.; Khatib, A.; Bonnell, E.; Sopkovicova, M.; Wellinger, R.J.; Nosek, J.; Tzfati, Y.; Neugeglise, C.; Tomaska, L. Identification of Telomerase RNAs in Species of the Yarrowia Clade Provides Insights into the Co-Evolution of Telomerase, Telomeric Repeats and Telomere-Binding Proteins. *Sci Rep* **2019**, *9*, 13365.
21. Niederer, R.O.; Papadopoulos, N.; Zappulla, D.C. Identification of Novel Noncoding Transcripts in Telomerase-Negative Yeast Using Rna-Seq. *Sci Rep* **2016**, *6*, 19376.
22. Guzman, P.A.; Sanchez, J.G. Characterization of Telomeric Regions from Ustilago Maydis. *Microbiology (Reading)* **1994**, *140 (Pt 3)*, 551-557.
23. Bautista-Espana, D.; Anastacio-Marcelino, E.; Horta-Valerdi, G.; Celestino-Montes, A.; Kojic, M.; Negrete-Abascal, E.; Reyes-Cervantes, H.; Vazquez-Cruz, C.; Guzman, P.; Sanchez-Alonso, P. The Telomerase Reverse Transcriptase Subunit from the Dimorphic Fungus Ustilago Maydis. *PLoS One* **2014**, *9*, e109981.
24. Yu, E.Y.; Kojic, M.; Holloman, W.K.; Lue, N.F. Brh2 and Rad51 Promote Telomere Maintenance in Ustilago Maydis, a New Model System of DNA Repair Proteins at Telomeres. *DNA Repair (Amst)* **2013**, *12*, 472-479.
25. Logeswaran, D.; Li, Y.; Akhter, K.; Podlevsky, J.D.; Olson, T.L.; Forsberg, K.; Chen, J.J. Biogenesis of Telomerase Rna from a Protein-Coding Mrna Precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2022**, *119*, e2204636119.
26. Sanchez-Alonso, P.; Guzman, P. Predicted Elements of Telomere Organization and Function in Ustilago Maydis. *Fungal Genet Biol* **2008**, *45 Suppl 1*, S54-62.
27. Holloman, W.K.; Schirawski, J.; Holliday, R. The Homologous Recombination System of Ustilago Maydis. *Fungal Genet Biol* **2008**, *45 Suppl 1*, S31-39.
28. Sanpedro-Luna, J.A.; Jacinto-Vazquez, J.J.; Anastacio-Marcelino, E.; Posadas-Gutierrez, C.M.; Olmos-Pineda, I.; Gonzalez-Bernal, J.A.; Carcano-Montiel, M.; Vega-Alvarado, L.; Vazquez-Cruz, C.; Sanchez-Alonso, P. Telomerase Rna Plays a Major Role in the Completion of the Life Cycle in Ustilago Maydis and Shares Conserved Domains with Other Ustilaginales. *PLoS One* **2023**, *18*, e0281251.
29. Andrews, S. Fastqc: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online at: **2010**, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>,
30. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114-2120.
31. Grabherr, M.G.; Haas, B.J.; Yassour, M.; Levin, J.Z.; Thompson, D.A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; Chen, Z.; Mauceli, E.; Hacohen, N.; Gnirke, A.; Rhind, N.; di Palma, F.; Birren, B.W.; Nusbaum, C.; Lindblad-

- Toh, K.; Friedman, N.; Regev, A. Full-Length Transcriptome Assembly from Rna-Seq Data without a Reference Genome. *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 644-652.
32. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **2012**, *9*, 357-359.
33. Li, B.; Dewey, C.N. Rsem: Accurate Transcript Quantification from Rna-Seq Data with or without a Reference Genome. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 323.
34. Jimenez-Jacinto, V.; Sanchez-Flores, A.; Vega-Alvarado, L. Integrative Differential Expression Analysis for Multiple Experiments (Ideamex): A Web Server Tool for Integrated Rna-Seq Data Analysis. *Front Genet* **2019**, *10*, 279.
35. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for Rna-Seq Data with Deseq2. *Genome Biol* **2014**, *15*, 550.
36. Tarazona, S.; Garcia-Alcalde, F.; Dopazo, J.; Ferrer, A.; Conesa, A. Differential Expression in Rna-Seq: A Matter of Depth. *Genome Res* **2011**, *21*, 2213-2223.
37. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma Powers Differential Expression Analyses for Rna-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, e47.
38. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. Edger: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139-140.
39. Bryant, D.M.; Johnson, K.; DiTommaso, T.; Tickle, T.; Couger, M.B.; Payzin-Dogru, D.; Lee, T.J.; Leigh, N.D.; Kuo, T.H.; Davis, F.G.; Bateman, J.; Bryant, S.; Guzikowski, A.R.; Tsai, S.L.; Coyne, S.; Ye, W.W.; Freeman, R.M., Jr.; Peshkin, L.; Tabin, C.J.; Regev, A.; Haas, B.J.; Whited, J.L. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep* **2017**, *18*, 762-776.
40. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **1990**, *215*, 403-410.
41. Finn, R.D.; Clements, J.; Eddy, S.R. Hmmer Web Server: Interactive Sequence Similarity Searching. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, W29-37.
42. Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. Signalp 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions. *Nat Methods* **2011**, *8*, 785-786.
43. Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L. Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J Mol Biol* **2001**, *305*, 567-580.
44. Donaldson, M.E.; Ostrowski, L.A.; Goulet, K.M.; Saville, B.J. Transcriptome Analysis of Smut Fungi Reveals Widespread Intergenic Transcription and Conserved Antisense Transcript Expression. *BMC Genomics* **2017**, *18*, 340.
45. Kamper, J.; Kahmann, R.; Bolker, M.; Ma, L.J.; Brefort, T.; Saville, B.J.; Banuett, F.; Kronstad, J.W.; Gold, S.E.; Muller, O.; Perlin, M.H.; Wosten, H.A.; de Vries, R.; Ruiz-Herrera, J.; Reynaga-Pena, C.G.; Snetselaar, K.; McCann, M.; Perez-Martin, J.; Feldbrugge, M.; Basse, C.W.; Steinberg, G.; Ibeas, J.I.; Holloman, W.; Guzman, P.; Farman, M.; Stajich, J.E.; Sentandreu, R.; Gonzalez-Prieto, J.M.; Kennell, J.C.; Molina, L.; Schirawski, J.; Mendoza-Mendoza, A.; Greilinger, D.; Munch, K.; Rossel, N.; Scherer, M.; Vranes, M.; Ladendorf, O.; Vincon, V.; Fuchs, U.; Sandrock, B.; Meng, S.; Ho, E.C.; Cahill, M.J.; Boyce, K.J.; Klose, J.; Klosterman, S.J.; Deelstra, H.J.; Ortiz-Castellanos, L.; Li, W., et al. Insights from the Genome of the Biotrophic Fungal Plant Pathogen *Ustilago Maydis*. *Nature* **2006**, *444*, 97-101.
46. Sanchez-Alonso, P.; Guzman, P. Organization of Chromosome Ends in *Ustilago Maydis*. Recq-Like Helicase Motifs at Telomeric Regions. *Genetics* **1998**, *148*, 1043-1054.
47. Farman, M.L.; Leong, S.A. Genetic and Physical Mapping of Telomeres in the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe Grisea*. *Genetics* **1995**, *140*, 479-492.
48. Gao, W.; Khang, C.H.; Park, S.Y.; Lee, Y.H.; Kang, S. Evolution and Organization of a Highly Dynamic, Subtelomeric Helicase Gene Family in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe Grisea*. *Genetics* **2002**, *162*, 103-112.
49. Dutheil, J.Y.; Munch, K.; Schotanus, K.; Stukenbrock, E.H.; Kahmann, R. The Insertion of a Mitochondrial Selfish Element into the Nuclear Genome and Its Consequences. *Ecol Evol* **2020**, *10*, 11117-11132.
50. Ross-Macdonald, P.; Roeder, G.S. Mutation of a Meiosis-Specific Muts Homolog Decreases Crossing over but Not Mismatch Correction. *Cell* **1994**, *79*, 1069-1080.
51. Hollingsworth, N.M.; Ponte, L.; Halsey, C. Msh5, a Novel Muts Homolog, Facilitates Meiotic Reciprocal Recombination between Homologs in *Saccharomyces Cerevisiae* but Not Mismatch Repair. *Genes Dev* **1995**, *9*, 1728-1739.

52. Lynn, A.; Soucek, R.; Borner, G.V. Zmm Proteins During Meiosis: Crossover Artists at Work. *Chromosome Res* **2007**, *15*, 591-605.
53. Ferguson, D.O.; Rice, M.C.; Rendi, M.H.; Kotani, H.; Kmiec, E.B.; Holloman, W.K. Interaction between Ustilago Maydis Rec2 and Rad51 Genes in DNA Repair and Mitotic Recombination. *Genetics* **1997**, *145*, 243-251.
54. Holloman, W.K.; Schirawski, J.; Holliday, R. The Homologous Recombination System of Ustilago Maydis. *Fungal Genet Biol* **2008**, *45 Suppl 1*, S31-39.
55. Banuett, F.; Herskowitz, I. Discrete Developmental Stages During Teliospore Formation in the Corn Smut Fungus, Ustilago Maydis. *Development* **1996**, *122*, 2965-2976.
56. Perez-Martin, J.; Castillo-Lluva, S.; Sgarlata, C.; Flor-Parra, I.; Mielnichuk, N.; Torreblanca, J.; Carbo, N. Pathocycles: Ustilago Maydis as a Model to Study the Relationships between Cell Cycle and Virulence in Pathogenic Fungi. *Mol Genet Genomics* **2006**, *276*, 211-229.
57. Skibbe, D.S.; Doehlemann, G.; Fernandes, J.; Walbot, V. Maize Tumors Caused by Ustilago Maydis Require Organ-Specific Genes in Host and Pathogen. *Science* **2010**, *328*, 89-92.
58. Doehlemann, G.; van der Linde, K.; Assmann, D.; Schwammbach, D.; Hof, A.; Mohanty, A.; Jackson, D.; Kahmann, R. Pep1, a Secreted Effector Protein of Ustilago Maydis, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *PLoS Pathog* **2009**, *5*, e1000290.
59. Garcia-Muse, T.; Steinberg, G.; Perez-Martin, J. Characterization of B-Type Cyclins in the Smut Fungus Ustilago Maydis: Roles in Morphogenesis and Pathogenicity. *J Cell Sci* **2004**, *117*, 487-506.
60. Castillo-Lluva, S.; Alvarez-Tabares, I.; Weber, I.; Steinberg, G.; Perez-Martin, J. Sustained Cell Polarity and Virulence in the Phytopathogenic Fungus Ustilago Maydis Depends on an Essential Cyclin-Dependent Kinase from the Cdk5/Pho85 Family. *J Cell Sci* **2007**, *120*, 1584-1595.
61. Flor-Parra, I.; Castillo-Lluva, S.; Perez-Martin, J. Polar Growth in the Infectious Hyphae of the Phytopathogen Ustilago Maydis Depends on a Virulence-Specific Cyclin. *Plant Cell* **2007**, *19*, 3280-3296.
62. Eichhorn, H.; Lessing, F.; Winterberg, B.; Schirawski, J.; Kamper, J.; Muller, P.; Kahmann, R. A Ferroxidation/Permeation Iron Uptake System Is Required for Virulence in Ustilago Maydis. *Plant Cell* **2006**, *18*, 3332-3345.
63. Mueller, O.; Kahmann, R.; Aguilar, G.; Trejo-Aguilar, B.; Wu, A.; de Vries, R.P. The Secretome of the Maize Pathogen Ustilago Maydis. *Fungal Genet Biol* **2008**, *45 Suppl 1*, S63-70.
64. Doyle, C.E.; Kitty Cheung, H.Y.; Spence, K.L.; Saville, B.J. Unh1, an Ustilago Maydis Ndt80-Like Protein, Controls Completion of Tumor Maturation, Teliospore Development, and Meiosis. *Fungal Genet Biol* **2016**, *94*, 54-68.
65. Lanver, D.; Berndt, P.; Tollot, M.; Naik, V.; Vranes, M.; Warmann, T.; Munch, K.; Rossel, N.; Kahmann, R. Plant Surface Cues Prime Ustilago Maydis for Biotrophic Development. *PLoS Pathog* **2014**, *10*, e1004272.
66. Khrunyk, Y.; Munch, K.; Schipper, K.; Lupas, A.N.; Kahmann, R. The Use of Flp-Mediated Recombination for the Functional Analysis of an Effector Gene Family in the Biotrophic Smut Fungus Ustilago Maydis. *New Phytol* **2010**, *187*, 957-968.
67. Schilling, L.; Matei, A.; Redkar, A.; Walbot, V.; Doehlemann, G. Virulence of the Maize Smut Ustilago Maydis Is Shaped by Organ-Specific Effectors. *Mol Plant Pathol* **2014**, *15*, 780-789.
68. Matei, A.; Ernst, C.; Gunl, M.; Thiele, B.; Altmuller, J.; Walbot, V.; Usadel, B.; Doehlemann, G. How to Make a Tumour: Cell Type Specific Dissection of Ustilago Maydis-Induced Tumour Development in Maize Leaves. *New Phytol* **2018**, *217*, 1681-1695.
69. Okmen, B.; Mathow, D.; Hof, A.; Lahrmann, U.; Assmann, D.; Doehlemann, G. Mining the Effector Repertoire of the Biotrophic Fungal Pathogen Ustilago Hordei During Host and Non-Host Infection. *Mol Plant Pathol* **2018**, *19*, 2603-2622.
70. Martinez-Soto, D.; Robledo-Briones, A.M.; Estrada-Luna, A.A.; Ruiz-Herrera, J. Transcriptomic Analysis of Ustilago Maydis Infecting Arabidopsis Reveals Important Aspects of the Fungus Pathogenic Mechanisms. *Plant Signal Behav* **2013**, *8*,
71. Tomonaga, T.; Nagao, K.; Kawasaki, Y.; Furuya, K.; Murakami, A.; Morishita, J.; Yuasa, T.; Sutani, T.; Kearsey, S.E.; Uhlmann, F.; Nasmyth, K.; Yanagida, M. Characterization of Fission Yeast Cohesin: Essential Anaphase Proteolysis of Rad21 Phosphorylated in the S Phase. *Genes Dev* **2000**, *14*, 2757-2770.

72. Xu, H.; Balakrishnan, K.; Malaterre, J.; Beasley, M.; Yan, Y.; Essers, J.; Appeldoorn, E.; Tomaszewski, J.M.; Vazquez, M.; Verschoor, S.; Lavin, M.F.; Bertonecello, I.; Ramsay, R.G.; McKay, M.J. Rad21-Cohesin Haploinsufficiency Impedes DNA Repair and Enhances Gastrointestinal Radiosensitivity in Mice. *PLoS One* **2010**, *5*, e12112.
73. Deardorff, M.A.; Wilde, J.J.; Albrecht, M.; Dickinson, E.; Tennstedt, S.; Braunholz, D.; Monnich, M.; Yan, Y.; Xu, W.; Gil-Rodriguez, M.C.; Clark, D.; Hakonarson, H.; Halbach, S.; Michelis, L.D.; Rampuria, A.; Rossier, E.; Spranger, S.; Van Maldergem, L.; Lynch, S.A.; Gillissen-Kaesbach, G.; Ludecke, H.J.; Ramsay, R.G.; McKay, M.J.; Krantz, I.D.; Xu, H.; Horsfield, J.A.; Kaiser, F.J. Rad21 Mutations Cause a Human Cohesinopathy. *Am J Hum Genet* **2012**, *90*, 1014-1027.
74. Mielnichuk, N.; Sgarlata, C.; Perez-Martin, J. A Role for the DNA-Damage Checkpoint Kinase Chk1 in the Virulence Program of the Fungus *Ustilago Maydis*. *J Cell Sci* **2009**, *122*, 4130-4140.
75. Ludwig, N.; Reissmann, S.; Schipper, K.; Gonzalez, C.; Assmann, D.; Glatter, T.; Moretti, M.; Ma, L.S.; Rexer, K.H.; Snetselaar, K.; Kahmann, R. A Cell Surface-Exposed Protein Complex with an Essential Virulence Function in *Ustilago Maydis*. *Nat Microbiol* **2021**, *6*, 722-730.
76. Reyes-Fernandez, E.Z.; Shi, Y.M.; Grun, P.; Bode, H.B.; Bolker, M. An Unconventional Melanin Biosynthesis Pathway in *Ustilago Maydis*. *Appl Environ Microbiol* **2021**, *87*,
77. Mei, B.; Budde, A.D.; Leong, S.A. Sid1, a Gene Initiating Siderophore Biosynthesis in *Ustilago Maydis*: Molecular Characterization, Regulation by Iron, and Role in Phytopathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 903-907.
78. Pothiratana, C. Functional Characterization of the Homeodomain Transcription Factor Hdp1 in *Ustilago Maydis*. *PhD. Dissertation of the Faculty of Biology, Philipps-University Marburg* **2007**,
79. Zahiri, A.; Heimel, K.; Wahl, R.; Rath, M.; Kamper, J. The *Ustilago Maydis* Forkhead Transcription Factor Fox1 Is Involved in the Regulation of Genes Required for the Attenuation of Plant Defenses During Pathogenic Development. *Mol Plant Microbe Interact* **2010**, *23*, 1118-1129.
80. Heimel, K.; Scherer, M.; Vranes, M.; Wahl, R.; Pothiratana, C.; Schuler, D.; Vincon, V.; Finkernagel, F.; Flor-Parra, I.; Kamper, J. The Transcription Factor Rbf1 Is the Master Regulator for B-Mating Type Controlled Pathogenic Development in *Ustilago Maydis*. *PLoS Pathog* **2010**, *6*, e1001035.
81. Lanver, D.; Muller, A.N.; Happel, P.; Schweizer, G.; Haas, F.B.; Franitza, M.; Pellegrin, C.; Reissmann, S.; Altmüller, J.; Rensing, S.A.; Kahmann, R. The Biotrophic Development of *Ustilago Maydis* Studied by Rna-Seq Analysis. *Plant Cell* **2018**, *30*, 300-323.
82. Pinter, N.; Hach, C.A.; Hampel, M.; Rekhter, D.; Zienkiewicz, K.; Feussner, I.; Poehlein, A.; Daniel, R.; Finkernagel, F.; Heimel, K. Signal Peptide Peptidase Activity Connects the Unfolded Protein Response to Plant Defense Suppression by *Ustilago Maydis*. *PLoS Pathog* **2019**, *15*, e1007734.
83. Asano, Y.; Hagiwara, D.; Yamashino, T.; Mizuno, T. Characterization of the Bzip-Type Transcription Factor Napa with Reference to Oxidative Stress Response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, *71*, 1800-1803.
84. Lev, S.; Hadar, R.; Amedeo, P.; Baker, S.E.; Yoder, O.C.; Horwitz, B.A. Activation of an Ap1-Like Transcription Factor of the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in Response to Oxidative Stress and Plant Signals. *Eukaryot Cell* **2005**, *4*, 443-454.
85. Leon-Ramirez, C.G.; Sanchez-Arreguin, J.A.; Cabrera-Ponce, J.L.; Martinez-Soto, D.; Ortiz-Castellanos, M.L.; Arechiga-Carvajal, E.T.; Salazar-Chavez, M.F.; Sanchez-Segura, L.; Ruiz-Herrera, J. Tec1, a Member of the Tea Transcription Factors Family, Is Involved in Virulence and Basidiocarp Development in *Ustilago Maydis*. *Int Microbiol* **2021**, *10.1007/s10123-021-00188-8*
86. Donaldson, M.E.; Meng, S.; Gagarinova, A.; Babu, M.; Lambie, S.C.; Swiadek, A.A.; Saville, B.J. Investigating the *Ustilago Maydis*/*Zea mays* Pathosystem: Transcriptional Responses and Novel Functional Aspects of a Fungal Calcineurin Regulatory B Subunit. *Fungal Genet Biol* **2013**, *58-59*, 91-104.
87. Lee, W. Comprehensive Discovery of Fungal Gene Clusters: Unexpected Co-Work Reflected at the Genomic Level. *PhD. Dissertation, Technische Universität München* **2010**,
88. Islamovic, E.; Garcia-Pedrajas, M.D.; Chacko, N.; Andrews, D.L.; Covert, S.F.; Gold, S.E. Transcriptome Analysis of a *Ustilago Maydis* Ust1 Deletion Mutant Uncovers Involvement of Laccase and Polyketide Synthase Genes in Spore Development. *Mol Plant Microbe Interact* **2015**, *28*, 42-54.
89. Romaniuk, A.; Paszel-Jaworska, A.; Toton, E.; Lisiak, N.; Holysz, H.; Krolak, A.; Grodecka-Gazdecka, S.; Rubis, B. The Non-Canonical Functions of Telomerase: To Turn Off or Not to Turn Off. *Mol Biol Rep* **2019**, *46*, 1401-1411.

90. Segal-Bendirdjian, E.; Geli, V. Non-Canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Front Cell Dev Biol* **2019**, *7*, 332.
91. Kedde, M.; le Sage, C.; Duursma, A.; Zlotorynski, E.; van Leeuwen, B.; Nijkamp, W.; Beijersbergen, R.; Agami, R. Telomerase-Independent Regulation of Atr by Human Telomerase Rna. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 40503-40514.
92. Eitan, E.; Tamar, A.; Yossi, G.; Peleg, R.; Braiman, A.; Priel, E. Expression of Functional Alternative Telomerase Rna Component Gene in Mouse Brain and in Motor Neurons Cells Protects from Oxidative Stress. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78297-78309.
93. Gazzaniga, F.S.; Blackburn, E.H. An Antiapoptotic Role for Telomerase Rna in Human Immune Cells Independent of Telomere Integrity or Telomerase Enzymatic Activity. *Blood* **2014**, *124*, 3675-3684.
94. Rubtsova, M.; Naraykina, Y.; Vasilkova, D.; Meerson, M.; Zvereva, M.; Prassolov, V.; Lazarev, V.; Manuvera, V.; Kovalchuk, S.; Anikanov, N.; Butenko, I.; Pobeguts, O.; Govorun, V.; Dontsova, O. Protein Encoded in Human Telomerase Rna Is Involved in Cell Protective Pathways. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, 8966-8977.
95. Li, S.; Crothers, J.; Haqq, C.M.; Blackburn, E.H. Cellular and Gene Expression Responses Involved in the Rapid Growth Inhibition of Human Cancer Cells by Rna Interference-Mediated Depletion of Telomerase Rna. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 23709-23717.
96. Liu, H.; Yang, Y.; Ge, Y.; Liu, J.; Zhao, Y. Terc Promotes Cellular Inflammatory Response Independent of Telomerase. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, 8084-8095.
97. Alcaraz-Perez, F.; Garcia-Castillo, J.; Garcia-Moreno, D.; Lopez-Munoz, A.; Anchelin, M.; Angosto, D.; Zon, L.I.; Mulero, V.; Cayuela, M.L. A Non-Canonical Function of Telomerase Rna in the Regulation of Developmental Myelopoiesis in Zebrafish. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3228.
98. Jose, S.S.; Tidu, F.; Burilova, P.; Kepak, T.; Bendickova, K.; Fric, J. The Telomerase Complex Directly Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Senescence in an Induced Pluripotent Stem Cell Model of Telomeropathy. *Front Genet* **2018**, *9*, 345.

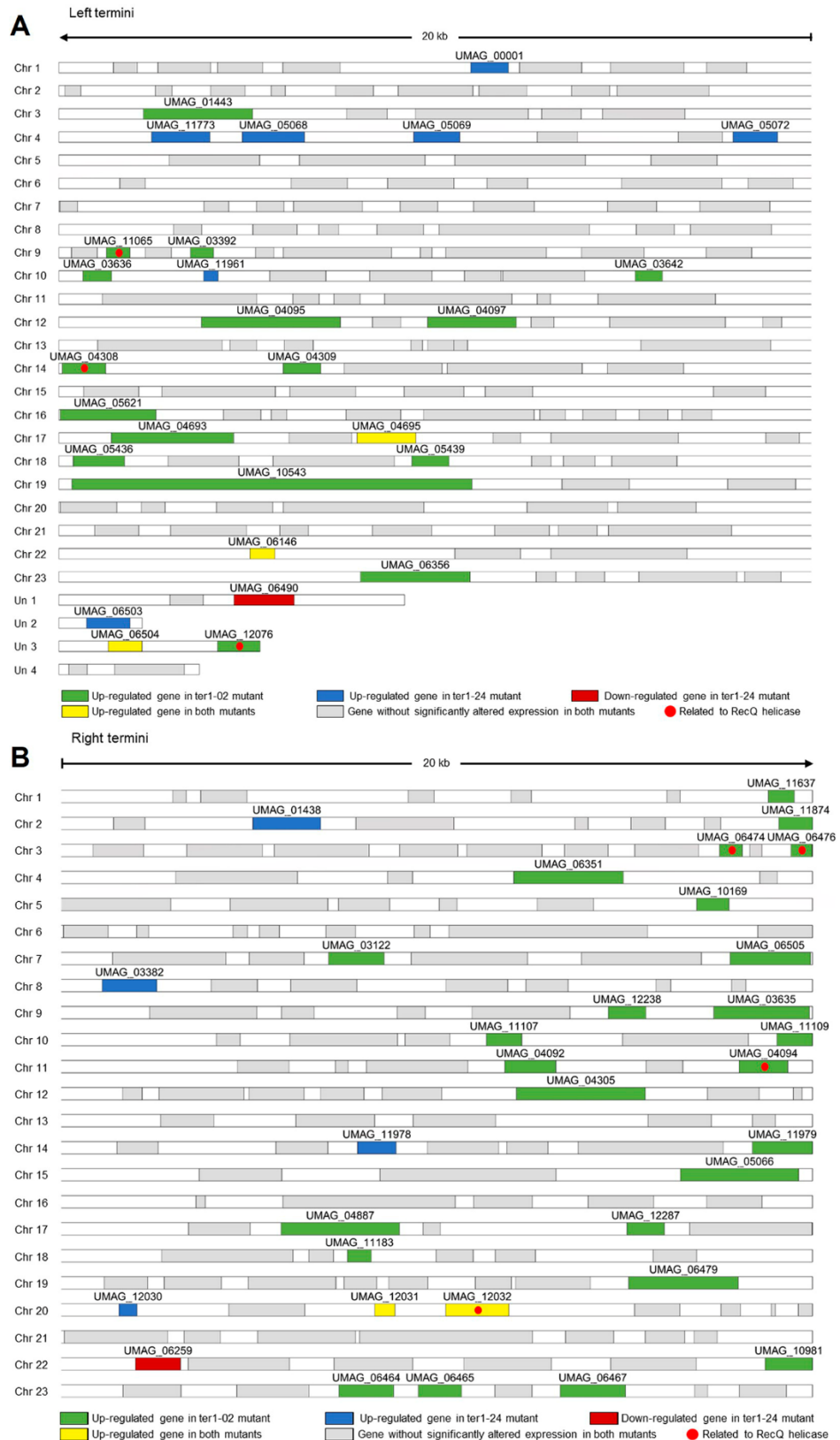


Figure S1. Transcriptional landscape of chromosomal ends of *U. maydis*. (A) Distribution of DEGs located in the 20 kb near the left end of the genome. (B) Distribution of DEGs located in the 20 kb near the right end of the genome.

RESEARCH ARTICLE

Telomerase RNA plays a major role in the completion of the life cycle in *Ustilago maydis* and shares conserved domains with other Ustilaginales

Juan Antonio Sanpedro-Luna¹, José Juan Jacinto-Vázquez¹, Estela Anastacio-Marcelino², Carmen María Posadas-Gutiérrez¹, Iván Olmos-Pineda³, Jesús Antonio González-Bernal⁴, Moisés Carcaño-Montiel², Leticia Vega-Alvarado⁵, Candelario Vázquez-Cruz^{1,2}, Patricia Sánchez-Alonso^{1,2*}

1 Instituto de Ciencias, Posgrado en Microbiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **2** Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **3** Facultad de Ciencias de la Computación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **4** Department of Computer Science and Engineering, The University of Texas Arlington, Arlington, Texas, United States of America, **5** Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

* maria.sanchez@correo.buap.mx



OPEN ACCESS

Citation: Sanpedro-Luna JA, Jacinto-Vázquez JJ, Anastacio-Marcelino E, Posadas-Gutiérrez CM, Olmos-Pineda I, González-Bernal JA, et al. (2023) Telomerase RNA plays a major role in the completion of the life cycle in *Ustilago maydis* and shares conserved domains with other Ustilaginales. PLoS ONE 18(3): e0281251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281251>

Editor: Arthur J. Lustig, Tulane University Health Sciences Center, UNITED STATES

Received: October 20, 2022

Accepted: January 18, 2023

Published: March 23, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281251>

Copyright: © 2023 Sanpedro-Luna et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw sequencing reads and expression are available from the Gene

Abstract

The RNA subunit of telomerase is an essential component whose primary sequence and length are poorly conserved among eukaryotic organisms. The phytopathogen *Ustilago maydis* is a dimorphic fungus of the order Ustilaginales. We analyzed several species of Ustilaginales to computationally identify the Telomere RNA (TER) gene *ter1*. To confirm the identity of the TER gene, we disrupted the gene and characterized telomerase-negative mutants. Similar to catalytic *TERT* mutants, *ter1Δ* mutants exhibit phenotypes of growth delay, telomere shortening and low replicative potential. *ter1*-disrupted mutants were unable to infect maize seedlings in heterozygous crosses and showed defects such as cell cycle arrest and segregation failure. We concluded that *ter1*, which encodes the TER subunit of the telomerase of *U. maydis*, have similar and perhaps more extensive functions than *trt1*.

Introduction

Telomerase is a ribonucleoprotein complex that synthesizes telomere repeats. It has two core components: the catalytic protein subunit, which has reverse transcriptase activity (telomerase reverse transcriptase; TERT), and the RNA moiety, which is noncovalently joined to TERT and is known as the telomerase RNA component (TER or TERC) [1,2]. TER contains a sequence that acts as a template for retrotranscription and extends the telomere 3'OH overhanging strand during the late S-phase of the cell cycle [3]. TERT is the limiting factor for telomerase regulation in higher eukaryotes, and many studies of TERT regulation have been performed in the context of the development of multicellular organisms; however, these same