

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



TESIS

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
INVOLUCRADAS EN LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA, Y LA
VIRULENCIA DEL HONGO *Ustilago maydis***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M en C. NUBIA ANDREA VILLOTA SALAZAR

REYNOSA, TAMPS.

OCTUBRE, 2019

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



TESIS

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
INVOLUCRADAS EN LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA, Y LA
VIRULENCIA DEL HONGO *Ustilago maydis***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M en C. NUBIA ANDREA VILLOTA SALAZAR

DIRECTORES:

Dr. JUAN MANUEL GONZÁLEZ PRIETO

Dr. ARTEMIO MENDOZA MENDOZA

REYNOSA, TAMPS.

OCTUBRE, 2019

El presente trabajo fue realizado en:

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México.

Laboratory of Fungal Genetics and Plant Pathology, Bio-Protection Research Centre, Lincoln University, Lincoln, Canterbury, New Zealand.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

Bajo la dirección de:

Dr. Juan Manuel González Prieto y Dr. Artemio Mendoza Mendoza

Con el apoyo de CONACYT.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 17 del mes de Septiembre del año 2019, la que suscribe Nubia Andrea Villota Salazar alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B141359, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Juan Manuel González Prieto, Dr. Artemio Mendoza Mendoza y cede los derechos del trabajo titulado “Estudio de la relación entre la función de las proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina y la virulencia del hongo *Ustilago maydis.*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nubia Andrea Villota Salazar



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de **REYNOSA, TAMPS.** siendo las **12:00** horas del día **28** del mes de **AGOSTO** del **2019** se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: **CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA** para examinar la tesis titulada: **Estudio de la relación entre la función de las proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina y la virulencia del hongo *Ustilago maydis*.** por el (la) alumno (a):

| | | | | | |
|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------|--------------|
| Apellido Paterno: | VILLOTA | Apellido Materno: | SALAZAR | Nombre (s): | NUBIA ANDREA |
|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------|--------------|

Número de registro: **B 1 4 1 3 5 9**

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: **DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **NO APROBAR** la tesis, en virtud de los motivos siguientes:

Comisión Revisora de Tesis

DR. JOSÉ LUIS HERNÁNDEZ MENDOZA

13809-EG-18, Colegiado, E3017

DR. XIANWU GUO

12914-ED-17, Colegiado, E3017

DR. VÍCTOR RICARDO MORENO MEDINA

12915-EF-17, Colegiado, E3013

DR. ARTEMIO MENDOZA MENDOZA

2º Director de Tesis
Profesor Externo

DR. JOSÉ RUIZ HERRERA

Profesor Externo

Presidente del Colegio de Profesores

DR. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ PÉREZ

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

ÍNDICE

| Sección | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | 14 |
| LISTA DE CUADROS | 21 |
| LISTA DE FIGURAS | 23 |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA | 27 |
| RESUMEN | 30 |
| ABSTRACT | 32 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 33 |
| 2 ANTECEDENTES | 36 |
| 2.1 Epigenética..... | 36 |
| 2.1.1 Cromatina y mecanismos de regulación epigenética en eucariotas | 37 |
| 2.1.2 Estudios en hongos | 50 |
| 2.2 <i>Ustilago maydis</i> (DC.) Corda..... | 70 |
| 2.2.1 Historia..... | 70 |
| 2.2.2 Clasificación..... | 73 |
| 2.2.3 Ciclo de vida..... | 75 |
| 2.2.4 Proliferación de las células haploides, crecimiento filamentoso y desarrollo de teliosporas | 80 |
| 2.2.5 Loci de apareamiento | 83 |
| 2.2.6 Rutas de señalización..... | 85 |
| 2.2.7 Otras formas filamentosas observadas en el laboratorio | 87 |
| 2.2.8 Genoma | 90 |
| 2.2.9 Epigenética | 93 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 96 |
| 4 HIPÓTESIS | 98 |
| 5 OBJETIVOS | 99 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL..... | 99 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 99 |
| 6 MATERIALES Y MÉTODOS | 100 |

| | |
|--|------------|
| 6.1 OBJETIVO 1..... | 100 |
| 6.2 OBJETIVO 2..... | 101 |
| 6.2.1 Cepas de trabajo y condiciones de cultivo..... | 101 |
| 6.2.2 Reacción Fuzz..... | 102 |
| 6.2.3 Plásmidos utilizados..... | 103 |
| 6.2.4 Preparación de células competentes..... | 103 |
| 6.2.5 Transformación genética de <i>E. coli</i> | 104 |
| 6.2.6 Extracción de DNA plasmídico..... | 105 |
| 6.2.7 Identificación de los genes de estudio en el genoma de <i>U. maydis</i> | 105 |
| 6.2.8 Extracción de DNA genómico..... | 105 |
| 6.2.9 Elaboración de casetes de interrupción para la mutación de genes que codifican para HKMTs, PRMTs y Sin3..... | 106 |
| 6.2.10 Síntesis de protoplastos de <i>U. maydis</i> | 107 |
| 6.2.11 Obtención y preparación de las construcciones de interrupción para transformación..... | 108 |
| 6.2.12 Transformación genética de <i>U. maydis</i> | 109 |
| 6.2.13 Verificación de las clonas transformantes..... | 109 |
| 6.2.14 Aislamiento de segregantes..... | 112 |
| 6.2.15 Identificación de segregantes..... | 113 |
| 6.2.16 Elaboración de construcciones para la complementación de las cepas mutantes | 114 |
| 6.2.17 Retrotransformación de las cepas mutantes con los casetes de complementación | 115 |
| 6.3 OBJETIVO 3..... | 115 |
| 6.3.1 Morfología..... | 115 |
| 6.3.2 Coloración con calcofluor blanco..... | 116 |
| 6.3.3 Cinética de crecimiento en MM..... | 116 |
| 6.3.4 Ensayo de crecimiento relativo en agar..... | 117 |
| 6.3.5 Transición dimórfica por pH..... | 117 |
| 6.3.6 Ensayos de resistencia al estrés osmótico y al Rojo Congo..... | 118 |
| 6.3.7 Ensayos de sensibilidad al estrés oxidativo por difusión de H ₂ O ₂ en disco..... | 118 |
| 6.4 OBJETIVO 4..... | 118 |
| 6.4.1 Ensayos de virulencia en maíz..... | 118 |
| 7 RESULTADOS | 120 |
| 7.1 OBJETIVO 1..... | 120 |

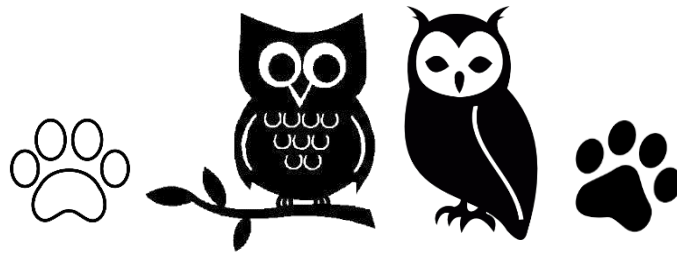
| | |
|--|-----|
| Revisar el estado del arte de la epigenética en organismos eucariotas | 120 |
| 7.2 OBJETIVO 2..... | 121 |
| 7.2.1 Identificación de los genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas y el regulador transcripcional Sin3 en <i>U. maydis</i> | 121 |
| 7.2.2 Elaboración de los casetes de interrupción para la mutación de los genes de estudio | 125 |
| 7.2.4 Interrupción de los genes <i>SUV39</i> , <i>SET1</i> , <i>PRMT1</i> y <i>SIN3</i> | 135 |
| 7.2.5 Aislamiento de segregantes | 144 |
| 7.2.6 Elaboración de los casetes de complementación y retro-transformación de las cepas mutantes..... | 145 |
| 7.3 OBJETIVO 2..... | 148 |
| 7.3.1 Morfología | 148 |
| 7.3.2 Crecimiento | 149 |
| 7.3.3 Reacción Fuzz | 160 |
| 7.3.4 Transición dimórfica por pH | 160 |
| 7.3.5 Sensibilidad al estrés oxidativo | 169 |
| 7.3.6 Sensibilidad al Rojo Congo..... | 169 |
| 7.3.7 Sensibilidad al estrés osmótico..... | 170 |
| 7.4 OBJETIVO 3..... | 177 |
| 8 DISCUSIÓN | 185 |
| 9 CONCLUSIONES | 202 |
| 10 REFERENCIAS | 204 |
| 11 APÉNDICE | 229 |

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado con amor a la memoria de:

Juan Manuel González Prieto

Y de nuestra pequeña familia



...en estos momentos es cuando la gente dice que la vida es injusta...
porque no tienes lo que quieres, no estas donde quisieras... no puedes
hacer totalmente lo que deseas.... sin embargo, yo sigo en espera de la
oportunidad para estar a tu lado...aunque sea unas horas... un día...
toda una vida.... lo que me queda de vida...

JMGP

Dr. Juan Manuel González Prieto
24 de mayo de 1970 - 11 de noviembre de 2018

El Dr. Juan Manuel González Prieto nació el 24 de mayo de 1970 en la ciudad de Irapuato, Guanajuato. Fue el hijo menor de una familia numerosa conformada por sus padres Nicolás y María Candelaria. Desde muy temprana edad se caracterizó por ser un buen hijo, hermano y amigo, por ser una persona noble, solidaria, creativa, traviesa, alegre y con un particular sentido del humor.

Juan Manuel llevó a cabo sus estudios como Químico Farmacobiólogo en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, lugar donde descubrió una de las pasiones que marcaron su vida, los hongos. Sus primeras experiencias con estos maravillosos organismos las tuvo con motivo del mantenimiento del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad, una etapa de su vida que recordaba con gran cariño y como uno de los pilares de su formación.

Fue precisamente la pasión por los hongos la que lo llevó a tomar la decisión de realizar sus estudios de Doctorado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV-Irapuato, bajo la dirección del Dr. José Ruiz Herrera, titulándose en el año 2003. En su paso por CINVESTAV, Juan Manuel se dedicó al estudio de los genes involucrados en la remodelación de la estructura de la cromatina en los hongos dimórficos *Ustilago maydis* y *Yarrowia lipolytica*, obteniendo el primer reporte de la participación de la acetilación de las histonas en el dimorfismo y la patogénesis de *U. maydis*. De igual forma, se adentró en el estudio de la filogenia y la clasificación de las proteínas quitinas sintasas fúngicas, trabajo que retomaría algunos años después. Como parte de su trabajo doctoral, Juan Manuel realizó una estancia en la Universidad de Salamanca, España, lugar donde hizo grandes amigos que siempre recordaría, y un día, esperaba volver a ver.

Al finalizar esta etapa, su camino lo llevó a realizar una estancia postdoctoral en la Unidad de Microbiología de Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de

Ensenada, CICESE, donde realizó trabajos relacionados con el crecimiento apical de los hongos filamentosos y el marcaje con GFP, bajo la dirección del Dr. Salomón Bartnicki García. Ambos, tanto el Dr. Ruiz Herrera, como el Dr. Bartnicki García, pusieron una huella indeleble en la vida académica, científica y personal de Juan Manuel, y fueron su ejemplo y referencia a lo largo de toda su carrera. Particularmente, siempre se sintió honrado por haber colaborado con el Dr. Ruiz Herrera, a quien consideraba no solo su mentor, sino su amigo.

En el año 2005, Juan Manuel regresó a CINVESTAV-Irapuato para una nueva estancia postdoctoral, la cual se centró en el análisis *in silico* del genoma del hongo *U. maydis*, investigación realizada en colaboración con el Instituto Max Planck, que derivó en la publicación de una carta en la revista Nature. En este mismo año, ingresó como profesor investigador al Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional, en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, como miembro del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Durante sus años en el CBG, Juan Manuel trabajó en la consolidación de líneas de investigación sobre biología molecular y epigenética de los hongos, así como el uso de estos microorganismos para biocontrol de patógenos y biorremediación de contaminantes tales como PAHs y pesticidas. Igualmente, dirigió trabajos relacionados con el efecto del cambio climático en la distribución del fríjol silvestre, descriptores ecológicos y de adaptación climática en el fríjol silvestre, la diversidad genética y filogenia de algunos hongos fitopatógenos, así como con la clasificación molecular de las proteínas quitina sintasas y remodeladoras de la estructura de la cromatina. Si bien a lo largo de los años Juan Manuel trabajó con varios hongos, su favorito y de quien estaba enamorado era del "huitlacoche".

En el CBG, Juan Manuel se destacó por sus conocimientos y experiencia en biología molecular e ingeniería genética, se desempeñó como el Líder del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y profesor titular de las asignaturas Biotecnología Genómica desde el año 2006 y Micotecnología desde el año 2017. Adicionalmente fue un participante constante de las materias Biotecnología Molecular y Celular, y Metodología de Investigación. De esta forma, Juan Manuel contribuyó a la formación científica de muchos

profesionales mexicanos y extranjeros, siempre ceñido a su característico rigor académico. Será recordado por su cercanía e interés genuino por los estudiantes, por sus clases de calidad y por haber sido un gran maestro.

Como miembro del CBG se preocupó por el interés común, más que por el particular. Quiso ser un apoyo para quienes lo rodeaban y para todo aquel que solicitaba su ayuda. Fue un hombre desprendido de lo material que procuró poner sus recursos a disposición de aquellos que los requerían. Para financiar muchos de sus proyectos científicos, así como para dar soporte a sus propios estudiantes, nunca dudó en recurrir a la que llamaba "La Fundación González-Prieto", dinero de su propio bolsillo que, sin pensarlo, destinaba para estas causas. Uno de sus propósitos de vida fue regresar en otros, la ayuda que en muchos momentos difíciles de su caminar, recibió por parte de profesores, amigos y familia.

Como director de tesis siempre se preocupó por que se llevaran a cabo estudios originales, completos y de calidad. Fue exigente y se aseguró, ante todo, del aprendizaje de sus dirigidos. Sin embargo, también fue un gran amigo, unos oídos dispuestos a escuchar los problemas y las angustias de la vida, una mente y corazón abiertos para brindar los consejos más acertados, unos brazos abiertos para dar los mejores abrazos, y unas manos dispuestas para brindar lo que denominaba "ayuda efectiva". Juan Manuel disfrutaba de cuidar de los demás. Juan Manuel siempre pensaba en positivo, Juan Manuel era incondicional, un ser agradecido, sensible, tierno, amoroso, imaginativo, era un soñador.

Desde su primera asistencia en 1995, fue un aficionado a los Congresos de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, eventos que consideraba como los mejores en México para la divulgación de la ciencia. Siempre se preocupó porque sus alumnos tuvieran la experiencia de asistir a tan importantes escenarios, y conocer de primera mano, el quehacer científico del país. Es una ironía muy grande, que en el cumplimiento de su deseo de permitir a sus estudiantes participar del XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, Juan Manuel haya perdido la vida.

El vacío que deja en todos aquellos que lo conocimos y amamos es infinito. Es un dolor indescriptible, una pena demasiado profunda. Se truncaron abruptamente los proyectos, los planes, las risas y los sueños. Esta es una tragedia que no tiene explicación, no obstante, hasta el último momento de su existencia, Juan Manuel cumplió con su deber, y es obligación de todos los que lo quisimos, seguir adelante con su ejemplo, sus enseñanzas y mantener vigente su legado. Juan Manuel, el hombre que manifestaba ser inmortal, ha muerto; no obstante, seguirá siempre vivo a través de su producción académica y científica, a través de los recursos humanos que formó y de las vidas que transformó. Para mí, siempre estará vivo a través de su música favorita y su otra gran pasión, el metal. Un gusto incomprendido por muchos, la música con la cual él se identificaba, se relajaba, se divertía, se liberaba, podía ser el mismo y le servía de refugio en los días difíciles. El metal movía su ser, le permitía transportarse, a través de los riffs de las guitarras, a otras realidades, a otros momentos y lugares, lo hacía sentir vivo. Siempre que lo quieran recordar, escuchen una buena canción de metal, la música que lo acompañó hasta el último segundo de su vida. Cuando piense en él, también lo imaginaré manejando con decisión y gusto su auto, al cual cariñosamente le decía "la rata", por las carreteras mexicanas, haciendo travesías que nadie más se atrevería a hacer, con música a todo volumen, acompañado por sus perras (Nube y Molly) y el corazón de su copiloto que lo ama, para siempre....

Nubia Andrea Villota Salazar
Centro de Biotecnología Genómica
6/12/18

AGRADECIMIENTOS

Ha pasado casi un año desde que la tragedia golpeó a mi puerta, aun así, no puedo evitar escribir estas palabras en medio de lágrimas. Hubiera querido que esta etapa de mi vida, la cual finaliza con el término de mis estudios de doctorado, se desarrollara de forma diferente, sin embargo, las decisiones, los acontecimientos y el azar han determinado otra cosa. Quiero agradecer inmensamente a Juan Manuel González Prieto por haber sido mi maestro, mi amigo, mi pareja, mi compañero de vida, mi todo. Por los años que estuvimos juntos y en los que fuimos, a nuestro modo, muy felices. Por ese amor gigantesco, infinito, puro, que tuvo por mí. Por su apoyo constante, por creer en mí, por cuidarme siempre... hasta en el último momento, con la última sinapsis. A Juan Manuel le debo más de lo que podría enumerar o describir, soy muy afortunada de que haya sido parte fundamental de mi vida y no pasará un día en el que no me duela que lo hayan apartado de mí. Vivir sin él es un reto que he tenido que aprender a sortear día con día.

Como director de este trabajo, le agradezco todo lo que me enseñó, que me llevara al límite y sacara lo mejor de mí. Agradezco su confianza, la libertad que me otorgó para el desarrollo de mis actividades, la discusión constante de los temas de nuestro quehacer diario, la importancia y el respeto que brindó a mis ideas y a mis opiniones. Le agradezco que desde mi experiencia me permitiera aportar en otros trabajos y actividades, así como participar de la formación de otras personas. Le agradezco su paciencia, sus palabras, consejos y reflexiones en los momentos difíciles. Gracias por brindarme siempre todo lo necesario para sacar este proyecto adelante y por participar activamente en su desarrollo. Sé que Juan Manuel estaba orgulloso de mi y de lo que logramos, sin embargo, me entristece profundamente que no haya podido leer una sola palabra de este escrito, que no haya podido presenciar la culminación de nuestro estudio. Me duele y siempre me dolerá inmensamente no poder saber qué piensa de lo que se plasma a lo largo de estas páginas.

Quiero agradecer a mi papá, Mario Bernardo Villota, a mi mamá, Nubia Consuelo Salazar, y a mi hermano, Francisco Javier Villota Salazar, por todo su amor y apoyo, ahora y

siempre. Mis padres son la razón por la cual amo la ciencia. Desde muy temprana edad, consciente o inconscientemente, ellos me mostraron el mundo como era, no a través de fantasías o supersticiones, y su ejemplo me impulsó a leer, a encontrar la verdad. A mi mente viene uno de los primeros libros que leí, titulado, "El Mundo y sus Demonios", y una frase del científico Carl Sagan donde afirma ... *cuando echo la vista atrás me parece que lo más esencial no lo aprendí de mis maestros de escuela, ni siquiera de mis profesores de universidad, sino de mis padres, que no sabían nada en absoluto de ciencia...* Su influencia me llevó por este camino de preguntas, ideas, hipótesis y experimentos. A mis padres agradezco todos su afecto y sacrificios. A pesar de las dificultades, ellos hicieron todo lo necesario para que me pudiera formar y tuviera la oportunidad de luchar por mis sueños y metas. Son para mí son el reflejo de la fortaleza, la persistencia y la esperanza. Ellos han sido uno de los motores de mi vida, un motivo constante para seguir adelante. Gracias por darme abrigo, amor, soporte y cuidado en las horas más oscuras. Espero que estén orgullosos, mis logros les pertenecen.

A mi hermano, le adeudo no haberme permitido caer en el abismo, como el principal artífice de mi recuperación, me ha brindado todo lo necesario para recuperar mi salud y culminar este trabajo. Pacho me ha abierto generosamente las puertas de su vida y después de muchos años de distancia, hemos tenido el re-encuentro más inesperado. Le agradezco su amor, su constante compañía, paciencia y apoyo en este proceso, sé que tampoco ha sido fácil para él. Los cuatro hemos sufrido mucho este episodio. Le agradezco no haber soltado mi mano desde el primer momento en que lo necesité, así como su firme decisión de hacerme brillar de nuevo. Pacho siempre ha sido un hermano maravilloso y no existen palabras suficientes para agradecer lo que hace por mí y por mis padres. Estoy muy orgullosa de la persona y el profesional en que se ha convertido, de todo lo que ha logrado con su inteligencia, esfuerzo y dedicación. Sé que seguirá cosechando muchos éxitos.

Quiero agradecer a mis amigos en Reynosa, a quienes quiero y llevo en mi mente. A Lourdes Vital por su gran corazón, por ser mi amiga y considerarme su amiga. Por todo su afecto y atenciones, por estar para mí en todo momento, en las buenas, y sobre todo en las malas, por ver en mí algo especial, ver mi esencia, lejos de los prejuicios y de las diferencias. Le agradezco el haber compartido muy de cerca mi dolor y haber hecho todo

lo posible por ayudarme, incluso en el laboratorio. Agradezco a Biyi por estar para mí a mi regreso al CBG. Agradezco que me brindara su amistad, aun sin haber sido cercanos previamente. Le agradezco escucharme a diario en medio de lágrimas y empatizar honestamente con mi dolor. Aun en mi cabeza se repiten sus palabras, *step by step, one day at a time...* Agradezco su capacidad de sacarme una sonrisa en medio de la tragedia, su solidaridad, su preocupación por mí, y *because until today, he is still checking how I am* ...Biyi es un gran ser humano. También agradezco a Jazmín Eliana Murcia, quien ha sido un angelito y ha estado presente para ayudarme en los momentos más difíciles de esta experiencia. Jazz también vivió muy íntimamente mi dolor y tuvo que pasar igualmente por el dolor personal de haber perdido a su maestro y amigo. Nos unen los últimos días que compartimos con Juan Manuel. Le agradezco su amor por mí y por él. Agradezco su compañía, sus palabras, que compartiera conmigo experiencias muy personales, y, sobre todo, su visión de la vida.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Reyes López y a su esposa Fátima Camacho, por recibirme a mí, a Pacho y a Jazz en su casa después del accidente, por ofrecerme y brindarme su ayuda completa e incondicional. Al Dr. Miguel le agradezco su infinita generosidad, su compañía en las mañanas rumbo al consultorio de la Licenciada Carmen, su ayuda cargando mi mochila todas las mañanas. Gracias por dejarme en mi lugar en el laboratorio cada día con un abrazo. A Fátima le agradezco todos sus cuidados, gracias por estar pendiente de mí y por colaborar en todo lo que necesité. Gracias por ayudarme a recoger y a organizar los pedazos de mi vida. Sé que la amistad de ambos siempre ha estado y estará para mí. Gracias por ser personas dispuesta a ayudar.

Agradezco a la Dra. Patricia Larralde, quien tiene un corazón gigante, por ayudarme a encontrar hogar para Nube y Molly, las niñas de Juan Manuel. Le agradezco mucho que adoptara a Nube, y le diera unas hermanas y un hogar que la hacen muy feliz. Nubecita es una gran perra y se merece todo lo mejor del mundo. Me llena de tranquilidad saber que ahora hace parte de la manada de la Dra. Paty. Molly se encuentra igualmente muy bien en su nuevo hogar, en compañía de su nueva hermana. Molly es una perrita traviesa y llena de energía, pero con grandes sentimientos. Sé que también está rodeada de buenos cuidados y de mucho afecto. A Nube y a Molly les agradezco que hayan llenado nuestro

pequeño hogar de alegría, ternura y amor, y que hayan sido una fuente de felicidad para mí y para Juan Manuel. Extraño mucho la vida que teníamos. Las amo mucho.

Agradezco a Cristian Lizarazo, a Lupita Castillejos, y a sus hijas, Mariana y Fátima, por abrirme sus brazos y recibirme con afecto en su hogar. Regresar a Reynosa fue emocionalmente muy difícil y ellos estuvieron junto a mí para apoyarme, brindarme todo lo que necesité y darme mucho ánimo. Gracias por su compañía y confianza, por escucharme y compartir su vida conmigo. A Marianita y a Fátima les agradezco su alegría y su cariño. Me hicieron mucho bien los días que pasamos juntos (dedito). Igualmente agradezco a Paola Charles, Jairo Mondragón y Cesar Ruge por estar presentes sin dudarlos y desde el primer momento, para proporcionarme su ayuda y apoyo en diferentes momentos de este proceso. Son grandes personas y su amistad significa mucho para mí.

Agradezco a María Fernanda Rosado por querer sinceramente a Juan Manuel y valorar como pocos su exigencia, sus regañones y sus consejos. Por ser capaz de ver la esencia de una persona que quería sacar lo mejor de ella y hacerla verdaderamente maestra. Por atesorar la amistad y el afecto que él le brindó. En sus ojos pude ver el dolor profundo que significó la pérdida de su maestro, de su amigo. Como en muy pocas personas, en sus palabras aun puedo sentir ese dolor. Sé perfectamente que su pérdida es infinita. En su día a día, ella sigue su ejemplo y sus enseñanzas, el mejor homenaje a su memoria. Gracias por ser una persona tan hermosa, por el apoyo, por ser mi compañera en este duelo.

Amigos míos, como se los dije en persona, todos ustedes son mi belleza inesperada.....

Agradezco a Martha Viviana Roa Cordero y a Oscar Ernesto Rueda, por ser mi familia. Agradezco especialmente a Martuchis por ser mi amiga y confidente durante más de 10 años, agradezco su amor. Su apoyo ha sido muy importante en esta parte del camino. Sé lo valioso que Juan Manuel es en su vida, se lo que significa para ella, sé que no pasa un día sin que piense en él. Gracias por escuchar constantemente mis ideas, pensamientos y sentimientos. Gracias por creer en mí y motivarme a continuar a pesar del dolor. Agradezco igualmente a mis compañeros de Licenciatura en Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander, Dana Lena, Jonathan, Iris Lorena, Edith, Diana Jennifer, María Lilian, Diego, Laura Andrea y Mayerly, por toda su

solidaridad en este episodio. Fue muy lindo saber que aún me recuerdan. Agradezco especialmente a German Zafra por seguir siendo mi amigo a la distancia.

Agradezco a mi familia en Bogotá, Fusagasugá y Argentina, mis tíos y primos, por todo su apoyo y afecto, especialmente hacia mis padres. Nos unen profundamente el ejemplo y el recuerdo de nuestros abuelos, los viejos y los nuevos tiempos. Ese lazo de amor es inquebrantable. Agradezco a mi tía Rosa y a mi tía Ximena quienes siempre han sido muy cercanas a mi familia y nos han apoyado con amor en varios momentos de la vida. A mi tía Rosa le agradezco todo su afecto, su bondad, su fortaleza, su orgullo por nuestros logros y su amor por nuestra familia. Gracias por estar pendiente de nosotros, por sus oraciones, por superar las barreras tecnológicas y de la edad. Un abrazo del oso.

Agradezco a la familia Leyva González, a Rosa González y su familia, por contactarme, ofrecerme su amistad y apoyo durante estos meses, por abrirme la puerta de sus vidas. Este es un gesto que tiene un gran significado para mí. Para nosotros ha sido muy agradable conocerlos y compartir con personas tan cálidas y generosas. Gracias por tenernos en cuenta siempre. Nos unen los recuerdos y el amor por Juan Manuel.

Agradezco al Laboratorio de Biotecnología Vegetal por ser mi casa desde 2011. Agradezco a todos los profesores y compañeros que han sido parte desde entonces. El Laboratorio de Biotecnología Vegetal me proporcionó un espacio excelente de trabajo donde adquirí muchos conocimientos, una gran formación, y tuve todo lo necesario para sacar adelante mis proyectos. Siempre extrañaré el tiempo que pase en el lab... mi rutina...A mi mente solo vienen buenos recuerdos. Agradezco a la Maestra Sanjuana Hernández por ser un apoyo incondicional para todos los que hemos pasado por el laboratorio, y por ser uno de sus pilares fundamentales. Ella es quien mantiene viva su historia y seguirá perpetuando su legado. También agradezco a mi compañero Víctor Hugo Ramos su apoyo en nuestros días de experimentos. Aprendí mucho de él. Hugo es un ejemplo de superación, perseverancia y nobleza. Gracias por ser un buen amigo y compañero de ruta.

Agradezco a Casandra, a Tamar y a Israel, por ser amigos entrañables, nuestra amistad ha superado el paso del tiempo, de las diferencias, y de las distancias. Es imposible mirar hacia atrás y no recordar toda nuestra locura, todas las sonrisas y carcajadas, lo inverosímil

y lo profundo, la imposibilidad de conocernos en un lugar como Reynosa, en fin... Guardo en un lugar especial de la memoria todos los momentos que pasamos juntos. Sé que siempre seremos amigos.

Agradezco al Dr. Artemio Mendoza Mendoza por creer en este trabajo, dirigirlo y ser parte fundamental del mismo. Le agradezco que me haya permitido ir a Nueva Zelanda, trabajar en su laboratorio y aprender. Esa ha sido una de las mejores experiencias de mi vida. Me enriqueció enormemente como profesional y como persona. Agradezco su valiosa experiencia, sus ideas y cada uno de sus aportes. Todo esto, sin lugar a dudas, elevó la calidad de nuestro estudio y abrió mucho más mis ojos a cerca del trabajo con *Ustilago maydis*. Gracias por toda su comprensión. También agradezco a su esposa Fernanda por toda la atención y hospitalidad durante el tiempo que compartimos en Christchurch.

Agradezco al comité tutorial de esta tesis, los Doctores Víctor Ricardo Moreno Medina, Xianwu Guo, José Luis Hernández Mendoza y José Ruiz Herrera, por el minucioso seguimiento que hicieron de este trabajo, por las críticas constructivas, sugerencias y discusiones que tuvimos alrededor del mismo. También agradezco a los Doctores Víctor Moreno, Xianwu Guo y José Luis Hernández por haber participado en mi formación durante mi paso por el Centro de Biotecnología Genómica. Al Dr. José Ruíz Herrera le agradezco adicionalmente el apoyo que nos brindó él y su laboratorio en diferentes etapas de esta investigación. Agradezco al CINVESTAV-Irapuato por recibirnos de la mejor forma cada vez que lo necesitamos, particularmente a Rosa, Jorge Eugenio y el fotógrafo, por su valiosa ayuda.

Agradezco al Centro de Biotecnología Genómica y al Instituto Politécnico Nacional por tenerme entre sus filas y brindarme la oportunidad de desarrollar mis estudios. Al personal administrativo por su colaboración a lo largo de los años. A la comunidad del CBG por su solidaridad y sus buenos deseos en el momento más difícil. A todos los compañeros que me visitaron en el hospital y a los que me han tendido la mano desde mi arribo a Reynosa. Agradezco a México, a su gente, y a sus instituciones por haberme brindado absolutamente todo durante el tiempo que he vivido en este hermoso país. Siempre me acompañaran la belleza de sus ciudades y pueblos, la diversidad de sus paisajes, la magnificencia de sus océanos, la riqueza infinita de su historia y su cultura. Amo a

México, siempre estará en mi corazón. Finalmente agradezco a Reynosa, ciudad que fue mi hogar por cerca de 7 años. Gracias por ser el escenario principal de las aventuras más memorables, un lugar donde fui muy feliz.

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | El código epigenético..... | 45 |
| 2 | Familias de metiltransferasas de histonas en hongos, marcas asociadas y efectos sobre la transcripción génica..... | 49 |
| 3 | Homología de las proteínas identificadas con respecto a las proteínas de otros organismos..... | 122 |
| 4 | Metiltransferasas de histonas y regulador transcripcional Sin3 en <i>U. maydis</i> | 126 |
| 5 | Iniciadores diseñados para la amplificación de los bordes de los genes de estudio..... | 128 |
| 6 | Iniciadores anidados diseñados para la amplificación de los genes de trabajo y de los casetes de interrupción..... | 129 |
| 7 | Enzimas empleadas para la liberación de los bordes de los genes clonados en el plásmido pCR-Blunt II Topo..... | 133 |
| 8 | Resultados de la prueba de Tukey para la determinación de diferencias en el crecimiento de las cepas evaluadas..... | 155 |
| 9 | Resultados de la prueba de Tukey para establecer diferencias entre la sensibilidad al H ₂ O ₂ de las cepas FB1 (<i>alb1</i>), AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>) y CAV3 (<i>alb1ΔPRMT1::PRMT1</i>)..... | 172 |
| 10 | Resultados de la prueba de Tukey para establecer diferencias entre la sensibilidad al H ₂ O ₂ de las cepas FB1 (<i>alb1</i>), OW4 (<i>alb1ΔSET1</i>) y COW4 (<i>alb1ΔSET1::SET1</i>)..... | 172 |
| 11 | Resultados de los ensayos de virulencia en invernadero..... | 179 |
| 12 | Resultados del análisis estadístico <i>post hoc</i> , para la determinación de diferencias en la virulencia entre las mezclas de FB1 (<i>alb1</i>) X FB2 (<i>a2b2</i>), AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>) X AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X CAV6 (<i>a2b2ΔPRMT1::PRMT1</i>) y | |

CAV3 (*a1b1ΔPRMT1::PRMT1*) X CAV6
(*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*)..... 181

13 Resultados del análisis estadístico *post hoc*, para la determinación de diferencias en la virulencia entre las mezclas de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*) y COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*)..... 183

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Cromatina y modificaciones epigenéticas sobre el DNA y las histonas.. | 44 |
| 2a | Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> . Parte 1..... | 79 |
| 2b | Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> . Parte 2..... | 80 |
| 3 | Estados morfológicos y división celular en <i>U. maydis</i> | 81 |
| 4 | Representación del loci tetrapolar <i>MAT</i> de <i>U. maydis</i> | 86 |
| 5 | Red de señalización durante el apareamiento de <i>U. maydis</i> | 87 |
| 6 | Representación esquemática de la cascada de factores de transcripción durante la regulación del crecimiento filamentoso y el desarrollo patogénico de <i>U. maydis</i> | 89 |
| 7 | Reconstrucción filogenética de las proteínas metiltransferasas de histonas en algunas especies de hongos..... | 124 |
| 8 | Reconstrucción filogenética de las proteínas Sin3 en algunas especies de hongos..... | 125 |
| 9 | Esquema de la elaboración de los casetes de interrupción para la transformación genética de <i>U. maydis</i> | 127 |
| 10 | Amplificación por PCR de los promotores y terminadores de los genes de estudio..... | 130 |
| 11 | Resultados del escrutinio de clonas y la secuenciación para la identificación de los plásmidos PZ_PromSET1 y PZ_TermSET1..... | 131 |
| 12 | Resultados del escrutinio de clonas y la secuenciación para la identificación de los plásmidos PZ_PromPRMT1 y PZ_TermPRMT1..... | 132 |
| 13 | Escisión de los bordes de los genes de estudio a partir del plásmido pCR-Blunt II Topo..... | 133 |

| | | |
|----|---|-----|
| 14 | Liberación y purificación del casete de resistencia a la higromicina.... | 134 |
| 15 | Resultados de las amplificaciones por PCR realizadas a partir de los productos de ligación, empleando los oligonucleótidos anidados..... | 135 |
| 16 | Purificación de las construcciones para transformación y verificación por digestión enzimática..... | 137 |
| 17 | Esquema del reemplazo de un gen silvestre por el casete de interrupción, en el genoma de <i>U. maydis</i> | 138 |
| 18 | Representación de la validación de las cepas mutantes por PCR..... | 139 |
| 19 | Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de <i>SUV39</i> | 125 |
| 20 | Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de <i>SET1</i> | 140 |
| 21 | Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de <i>PRMT1</i> | 141 |
| 22 | Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de <i>SIN3</i> | 142 |
| 23 | Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de <i>SIN3</i> , empleando un nuevo patrón de restricción..... | 143 |
| 24 | Resultados de la amplificación por PCR de los genes <i>pra1</i> , <i>pra2</i> , <i>bW1</i> , <i>bW2</i> y <i>hph</i> , a partir del DNA de las segregantes recuperadas..... | 144 |
| 25 | Esquema de la elaboración de las construcciones para complementación..... | 145 |
| 26 | Verificación por ensayo de PCR de la presencia del gen silvestre previamente removido, así como del casete de higromicina empleado para su interrupción, en el DNA de las clonas obtenidas luego del ensayo de complementación..... | 146 |
| 27 | Identificación de segregantes de COW4 (<i>a1b1ΔSET1::SET1</i>) x OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>), del sexo <i>a2b2</i> | 147 |
| 28 | Identificación de segregantes de CAV3 (<i>a1b1ΔPRMT1::PRMT1</i>) x AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>), del sexo <i>a2b2</i> | 147 |
| 29 | Morfología colonial de las cepas silvestres y mutantes en YPD, 72 h, 28 °C..... | 150 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 30 | Morfología celular de a) FB2 (<i>a2b2</i>), b) VS1 (<i>alb1ΔSUV39</i>), c) AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>)..... | 151 |
| 31 | Morfología celular de FB1 (<i>alb1</i>) y OW4 (<i>alb1ΔSET1</i>)..... | 152 |
| 32 | Tinción con calcofluor blanco de las células de a) FB1 (<i>alb1</i>), b) VS1 (<i>a2b2ΔSUV39</i>), c) AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>)..... | 153 |
| 33 | Tinción con calcofluor blanco de las células de a) FB1 (<i>alb1</i>), b) OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>)..... | 154 |
| 34 | Reversión del fenotipo mutante por la remoción del gen <i>SET1</i> , luego del ensayo de complementación..... | 155 |
| 35 | Cinética de crecimiento en MM de las cepas FB1 (<i>alb1</i>), AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>), OW4 (<i>alb1ΔSET1</i>) y VS2 (<i>alb1ΔSUV39</i>)..... | 156 |
| 36 | Ensayo de crecimiento relativo en agar MC, 28 °C, 72 h. 2 repeticiones..... | 157 |
| 37 | Evaluación del crecimiento en agar YPD a una temperatura de incubación de 37 °C, 48 h, 3 repeticiones..... | 158 |
| 38 | Evaluación del crecimiento en agar YPD a una temperatura de incubación de 17 °C, 72 h, 3 repeticiones..... | 159 |
| 39 | La síntesis del pigmento en las cepas mutantes de <i>SET1</i> es dependiente de la temperatura..... | 160 |
| 40 | Resultados del ensayo de crecimiento en diversas fuentes de carbono para las cepas mutantes en <i>SUV39</i> | 161 |
| 41 | Resultados del ensayo de crecimiento en diversas fuentes de carbono para las cepas mutantes en <i>PRMT1</i> | 162 |
| 42. | Resultados del ensayo de crecimiento en diversas fuentes de carbono para las cepas mutantes en <i>SET1</i> | 163 |
| 43 | La síntesis del pigmento en las cepas mutantes para <i>SET1</i> es dependiente de la fuente de carbono..... | 164 |
| 44 | Resultados del ensayo de reacción Fuzz entre las cepas FB1 (<i>alb1</i>) FB2 (<i>a2b2</i>), VS2 (<i>alb1ΔSUV39</i>) y VS1 (<i>a2b2ΔSUV39</i>)..... | 165 |
| 45 | Resultados del ensayo de reacción Fuzz entre las cepas FB1 (<i>alb1</i>) FB2 (<i>a2b2</i>), AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>), AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>), CAV3 (<i>alb1ΔPRMT1::PRMT1</i>), CAV6 (<i>a2b2ΔPRMT1::PRMT1</i>)..... | 166 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 46 | Resultados del ensayo de reacción Fuzz entre las cepas FB1 (<i>alb1</i>) FB2 (<i>a2b2</i>), OW4 (<i>alb1ΔSET1</i>), OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>), COW4 (<i>alb1ΔSET1::SET1</i>), COW1 (<i>a2b2ΔSET1::SET1</i>)..... | 166 |
| 47a | Ensayo de transición dimórfica por pH. Parte 1..... | 167 |
| 47b | Ensayo de transición dimórfica por pH. Parte 2..... | 168 |
| 48 | Resultados de las pruebas de resistencia al estrés oxidativo en MC..... | 171 |
| 49 | Diagrama de barras de error de la media del diámetro del halo de inhibición registrado por cepa..... | 172 |
| 50 | Resultados de la prueba de sensibilidad al Rojo Congo..... | 173 |
| 51 | Resultados de las pruebas de sensibilidad al estrés oxidativo para las cepas mutantes en <i>SUV39</i> | 174 |
| 52 | Resultados de las pruebas de sensibilidad al estrés oxidativo para las cepas mutantes en <i>PRMT1</i> | 175 |
| 53 | Resultados de las pruebas de sensibilidad al estrés oxidativo para las cepas mutantes en <i>SET1</i> | 176 |
| 54 | Escala de la severidad de los síntomas de la enfermedad empleada para la evaluación de los resultados de los ensayos de invernadero. Sin síntomas (0), clorosis y/o antocianinas (1), tumores pequeños (< 1 cm) (2), tumores grandes (> 1 cm) (3) y planta muerta (4)..... | 178 |
| 55 | Cuantificación de los síntomas de la enfermedad por <i>U. maydis</i> , en las plantas que fueron infectadas con las mezclas de FB1 (<i>alb1</i>) X FB2 (<i>a2b2</i>), VS2 (<i>alb1ΔSUV39</i>) X VS1 (<i>a2b2ΔSUV39</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X VS1 (<i>a2b2ΔSUV39</i>)..... | 180 |
| 56 | Cuantificación de los síntomas de la enfermedad por <i>U. maydis</i> , en las plantas que fueron infectadas con las mezclas de FB1 (<i>alb1</i>) X FB2 (<i>a2b2</i>), AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>) X AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X CAV6 (<i>a2b2ΔPRMT1::PRMT1</i>) y CAV3 (<i>alb1ΔPRMT1::PRMT1</i>) X CAV6 (<i>a2b2ΔPRMT1::PRMT1</i>)..... | 181 |
| 57 | Cuantificación de los síntomas de la enfermedad por <i>U. maydis</i> , en las plantas que fueron infectadas con las mezclas de FB1 (<i>alb1</i>) X FB2 (<i>a2b2</i>), OW4 (<i>alb1ΔSET1</i>) X OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>), FB1 (<i>alb1</i>) X COW1 (<i>a2b2ΔSET1::SET1</i>) y COW4 (<i>alb1ΔSET1::SET1</i>) X COW1 (<i>a2b2ΔSET1::SET1</i>)..... | 182 |
| 58 | Comparación de los tumores generados en las hojas de las plantas de maíz..... | 184 |

LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

| | |
|--------------|---|
| TET | <i>Ten eleven translocation</i> |
| 5mC | 5-metilcitosina |
| 5hmC | 5-hidroximetilcitosina |
| 5fC | 5-formilcitosina |
| 5caC | 5-carboxilcitosina |
| ncRNA | RNA no codificante |
| MBP | <i>Methyl-CpG binding protein</i> |
| TDG | <i>Thymine DNA glycosylase</i> |
| BER | <i>Base excision repair</i> |
| HAT | Acetiltransferasa de histonas |
| HDAC | Desacetilasa de histonas |
| SAM | S-adenosil metionina |
| HKMT | Metiltransferasa de lisina |
| PRMT | Metiltransferasa de arginina |
| MMA | Monometil arginina |
| HP1 | <i>Heterochromatin protein 1</i> |
| RIP | <i>Repeat-Induced Point Mutation</i> |
| SCANR | <i>Spliceosome-Coupled and Nuclear RNAi complex</i> |
| SIS | <i>Sex-Induced Silencing</i> |
| MIP | <i>Methylation Induced Premeiotically</i> |
| TE | Elemento transponible |
| iRNA | RNA de interferencia |
| ERCs | <i>Extrachromosomal rDNA circles</i> |
| Ori | Origen de replicación |

| | |
|--------------|--|
| LTRs | <i>Long terminal repeats</i> |
| TSA | Tricostatina A |
| SAHA | <i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i> |
| DSB | <i>Double strand break</i> |
| NHEJ | <i>Nonhomologous end joining</i> |
| DON | Deoxinivalenol |
| rRNA | RNA ribosomal |
| mRNA | RNA mensajero |
| rDNA | DNA ribosomal |
| MAPK | Proteínas kinasas activadas por mitógenos |
| PKA | Proteína kinasa A |
| AMP | Adenosín monofosfato |
| cAMP | AMP cíclico |
| YEPSL | <i>Yeast Extract Peptone Sucrose Light</i> |
| MM | Medio mínimo |
| MC | Medio completo |
| YPD | <i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i> |
| °C | Grados centígrados |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| h | Hora/horas |
| % | Porcentaje |
| PDA | <i>Potato Dextrose Agar</i> |
| g | Gramo/gramos |
| l | Litro/litros |
| ml | Mililitro/mililitros |
| M | Molar |
| µm | Micrómetro |
| Mb | Megabase/megabases |

| | |
|------------|-------------------------------------|
| OD | Densidad óptica |
| µg | Microgramo |
| min | Minuto/minutos |
| LB | Luria Bertani |
| pb | Pares de bases |
| mM | Milimolar |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| mg | Miligramo |
| µM | Micromolar |
| vol | Volumen/volúmenes |
| seg | Segundos |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| BFA | Brefeldin A |

RESUMEN

En los organismos eucariotas, las proteínas que participan de la remodelación de la cromatina son protagonistas principales de los procesos de regulación génica. Estas proteínas son las responsables de orquestrar los cambios funcionales y estructurales de la cromatina, que epigenéticamente controlan los eventos de diferenciación celular y desarrollo. A lo largo de los años, los hongos han sido considerados modelos excelentes para el estudio de fenómenos epigenéticos, y *Ustilago maydis* es uno de los organismos más empleados en investigación a nivel mundial. *U. maydis* es un hongo basidiomiceto, biótrofo, dimórfico, que infecta al maíz (*Zea mays* ssp. *mays*), causando la enfermedad del carbón común o “huitlacoche”. Esta patología se conoce por la emergencia de tumores en los tejidos infectados del hospedero, los cuales contienen en su interior masas de teliosporas de apariencia oscura. *U. maydis* atraviesa por cambios morfológicos y genéticos remarcables para completar su ciclo de vida, y estos cambios se encuentran bajo control epigenético.

En el presente trabajo, se interrumpieron de forma independiente tres genes que codifican para metiltransferasas de histonas en el genoma de *U. maydis*; y se caracterizaron los fenotipos derivados. Las proteínas metiltransferasas de histonas son escritores fundamentales del código epigenético. El gen *PRMT1* (metilación de H4R3) demostró ser importante para la respuesta del hongo a condiciones de estrés oxidativo y agentes que perturban la pared celular. De igual forma, es necesario para el apareamiento normal y la virulencia completa en el maíz. El gen *SET1* (metilación de H3K4) participa del establecimiento de la morfología celular normal del hongo, del tamaño y pigmentación de sus colonias. Es necesario además para las respuestas frente al estrés oxidativo, osmótico, y por agentes que dañan la pared celular. Su ausencia potencia la respuesta de antocianinas por parte de la planta. Finalmente, el gen *SUV39* (metilación de H3K9) es importante para el control del ciclo celular del hongo. Su ausencia genera mayor crecimiento de este y maduración acelerada de los tumores que produce. Estos se localizan principalmente en la vena central, por lo que el gen puede participar de la colonización del hospedero.

Estos resultados reflejan la importancia y diversidad de funciones que tienen las proteínas metiltransferasas de histonas en *U. maydis*. Este, además, es uno de los pocos reportes que asocian a la proteína Prmt1 con la virulencia de un fitopatógeno.

ABSTRACT

In eukaryotes, chromatin remodeling proteins are important protagonist of the gene regulation processes. These proteins are responsible for the structural and functional changes in chromatin that epigenetically control the cellular differentiation events in the organisms. Fungi are considered excellent models for the study of epigenetic phenomena and *Ustilago maydis* is one of the most used fungi in research. *U. maydis* is a biotrophic, dimorphic, basidiomycete that infects maize (*Zea mays* ssp. *mays*), causing smut disease or "huitlacoche". This disease is known for the emergence of galls in the infected host tissues, which contain inside of them masses of teliospores of dark appearance. *U. maydis* goes through remarkable morphological and genetic changes to complete its life cycle, and these changes are under epigenetic control.

In this work, we deleted independently three genes encoding for histone methyltransferases in the genome of *U. maydis*; and we characterize the derived phenotypes. Histone methyltransferases are fundamental writers of the epigenetic code. The *PRMT1* gene (H4R3 methylation) proved to be relevant in oxidative and cell wall stress responses. Similarly, *PRMT1* is important for correct mating and complete virulence in corn plant. The *SET1* gene (H3K4 methylation) participates in the establishment of the normal cell morphology, size and pigmentation of the colonies. SET1 is necessary for responses to oxidative, osmotic and cell wall stress. Its absence enhances the anthocyanin response by the plant. Finally, the *SUV39* gene (H3K9 methylation) is important for the control of the fungus cell cycle. Its deletion generates greater growth and accelerated maturation of the tumors produced. These are located mainly in the central vein, so the gene can participate in host colonization.

These results reflect the importance and diversity of functions that histone methyltransferases have in *U. maydis*. This is also one of the few reports that associate the Prmt1 protein with the virulence of a phytopathogen.

1 INTRODUCCIÓN

En los organismos eucariotas, los mecanismos de regulación epigenética, tales como, la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales sobre las histonas, controlan la expresión génica y la especialización celular. Estos mecanismos tienen como protagonistas principales, proteínas encargadas de llevar a cabo los cambios estructurales y funcionales sobre la cromatina, que son necesarios para el adecuado funcionamiento de las células. Las modificaciones covalentes sobre las histonas son cambios bioquímicos dinámicos y reversibles que ocurren en las terminaciones de las histonas por acción enzimática, dando lugar a un patrón molecular que señala la activación o la represión de la transcripción. Dicho patrón es reconocido por proteínas efectoras que actúan a través de complejos encargados de ejecutar las remodelaciones requeridas para la expresión o el silenciamiento de los genes (Allis *et al.*, 2007; Choudhuri *et al.*, 2010).

En la literatura se encuentran reportadas una variedad de modificaciones postraduccionales sobre las histonas, las cuales hacen parte de lo que se ha denominado como el código epigenético. Las modificaciones más estudiadas son la acetilación y la metilación. La acetilación es una modificación activadora de la transcripción, asociada a regiones de eucromatina. Por su parte, la metilación de las histonas puede señalar la expresión o el silenciamiento génico, de acuerdo con la posición del aminoácido que es modificado, por lo cual, se puede encontrar tanto en regiones eucromáticas como heterocromáticas. Existen evidencias de que las proteínas involucradas en el establecimiento, lectura, interpretación y remoción de las marcas sobre el DNA y la cromatina son fundamentales para la ocurrencia de los eventos de diferenciación celular en los eucariotas (Allis *et al.*, 2007; Rothbart y Strahl, 2014).

Recientemente, se han empleado diversos organismos modelo para el estudio de estos fenómenos epigenéticos. Los hongos se consideran modelos excelentes tanto por sus características particulares, como por las que comparten con eucariotas superiores (Aramayo y Selker, 2013; Grunstein y Gasser, 2013). Particularmente los hongos

patógenos de las plantas son relevantes debido a que han desarrollado una diversidad de estrategias que les permiten transgredir los sistemas de defensa de sus hospederos, alimentarse a partir de sus tejidos vivos, ocasionarles enfermedad y en algunos casos, la muerte. Los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos involucrados, están enmarcados en eventos de diferenciación celular y se encuentran bajo regulación epigenética (Agrios, 2005; Villota-Salazar, 2013).

Los mecanismos que los hongos fitopatógenos utilizan para atacar a sus hospederos necesitan ser elucidados si a futuro se pretende hacer un control efectivo de estos organismos para disminuir su impacto en la agricultura. Esto último cobra gran importancia si se tiene en cuenta que, a futuro, los requerimientos alimentarios y energéticos se incrementarán por el efecto de una población mundial que constantemente está en aumento (Lanver *et al.*, 2017).

Ustilago maydis es un hongo biótrofo, basidiomiceto que infecta el maíz (*Zea mays*) y a su ancestro el teocintle (*Zea mays spp. parviglumis*), ocasionando la enfermedad conocida como carbón común o “huitlacoche”. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de tumores en los tejidos infectados de la planta, los cuales contienen en su interior masas de teliosporas con apariencia oscura. Si bien el carbón común del maíz no es una de las enfermedades fúngicas más devastadoras para los cultivos, y su impacto económico no es el más notable, *U. maydis* es uno de los modelos más utilizados en el mundo para el estudio de los procesos de señalización celular, morfogénesis, dimorfismo, apareamiento, interacción planta-patógeno y patogénesis fúngica. Su particular ciclo de vida, la relativa sencillez para su manipulación en el laboratorio, la disponibilidad de diversas herramientas moleculares, celulares y fitopatológicas para su estudio, hacen de este organismo el modelo más importante entre los hongos biotróficos basidiomicetos (Kamper *et al.*, 2006; Klosterman *et al.*, 2007; Ruiz-Herrera, 2008).

En el presente trabajo se caracterizaron genes correspondientes a proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina en *U. maydis*, y se estableció su relación con la virulencia del hongo. Para esto, se identificaron varios genes de interés y se procedió a su interrupción en el organismo, empleando técnicas de ingeniería genética. Principalmente, se estudiaron genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas, las cuales,

como se verá más adelante, son escritores importantes del código epigenético y no han sido caracterizadas previamente en este organismo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Epigenética

El concepto de epigenética ha evolucionado sustancialmente desde que fue propuesto por primera vez en 1939 por el genetista y embriólogo escocés Conrad Hal Waddington, como una forma de dar solución definitiva a los debates surgidos entre las corrientes del preformacionismo y la epigénesis, acerca del origen, la formación y el desarrollo de los seres vivos. Estas discusiones, las cuales se prolongaron a lo largo de los siglos XVII, XVIII y XIX, involucraron a reconocidos investigadores y pensadores de la época, tales como Swammerdam, Malpighi, Spallanzani, Galeno y Harvey, entre otros. Waddington planteó que el desarrollo de los organismos involucra tanto elementos preformados, como no preformados, relacionando de esta forma los elementos causales del desarrollo (genes) y la embriología. Desde su perspectiva, la epigenética hace referencia entonces a los procesos a través de los cuales “el genotipo da lugar al fenotipo” (diferenciación celular) (Van Speybroeck *et al.*, 2002; Waddington, 1939).

La segunda aproximación importante hacia lo que actualmente se denomina epigenética se empezó a estructurar después de 1958, ante los reportes de varios fenómenos que evidenciaban fenotipos diversos en células genéticamente idénticas. Estos hallazgos fueron analizados por el biólogo y genetista David L. Nanney, quien propuso la existencia de dos sistemas de regulación, uno relacionado con los mecanismos de transcripción del DNA, al que denominó “genético”; y otro, encargado de determinar qué información se expresa en las células, o “epigenético”, cuyos efectos en el fenotipo pueden persistir a lo largo de varias generaciones (Nanney, 1958). En las décadas posteriores se llevaron a cabo los descubrimientos que han permitido determinar los mecanismos a través de los cuales opera dicho sistema de regulación epigenético, mecanismos que en su mayoría están restringidos a los organismos eucariotas y se encuentran relacionados estrechamente a la organización del material genético en el interior del núcleo (cromatina) (Villota-Salazar *et al.*, 2016).

En la actualidad, la epigenética se define como el estudio de los cambios heredables y reversibles en la expresión génica que ocurren en la ausencia de modificaciones de la secuencia del DNA (Riggs y Porter, 1996). Frecuentemente el término también se emplea para describir los procesos de regulación genética que ocurren a través de cambios en la estructura de la cromatina, incluso si estos cambios no son necesariamente heredados (Smith *et al.*, 2012). El requisito de la heredabilidad se encuentra aún bajo discusión, así como otros límites de lo que puede o no ser considerado como epigenética. Fenómenos como la herencia de características por circuitos de retroalimentación (operón *lac*), por conformación estructural o tridimensional (ciliados y priones) y la epigenética en bacterias, en principio también tienen cabida, así como todos aquellos fenómenos que se ajusten al significado literal de la palabra epigenética: “*Sobre la genética*”, “*Más allá de los genes*”, “*Sobre los genes*” (Mann, 2014).

2.1.1 Cromatina y mecanismos de regulación epigenética en eucariotas

Como ya se mencionó, la existencia de fenómenos epigenéticos en los organismos eucariotas se relaciona directamente con el hecho de que el DNA genómico se organiza al interior del núcleo en la cromatina, una estructura dinámica y compleja, conformada por la asociación entre el DNA, las histonas del nucleosoma y las proteínas no histonas. El nucleosoma es la unidad estructural y funcional de la cromatina, contiene 147 pb de DNA enrolladas alrededor de un octámero central compuesto por dos moléculas de cada una de las histonas medulares H2A, H2B, H3 y H4. Adicionalmente, al exterior del nucleosoma y en el punto en el que el DNA entra y sale de éste, se encuentra una molécula de la histona H1, para dar lugar al cromatosoma. Las histonas son proteínas pequeñas que se caracterizan por ser básicas y tener carga positiva, propiedades que les permiten asociarse de forma íntima con el DNA (interacciones electrostáticas). Cada una de las histonas tiene un dominio globular, un dominio denominado pliegue y prolongaciones amino y carboxilo terminales flexibles, con residuos que sufren modificaciones enzimáticas postraduccionales. Estas modificaciones químicas actúan como receptores sobre la superficie del nucleosoma y son reconocidas por complejos de proteínas efectoras

específicos, encargados de ejecutar cambios estructurales sobre la cromatina, en conjunto con los mecanismos que modifican directamente el DNA asociado (Battistini *et al.*, 2010; Luger, 2001).

El enrollamiento de miles de nucleosomas en varios niveles de compactación, permite el empaquetamiento del DNA en el núcleo de la célula. Sin embargo, el nucleosoma no solo es un dispositivo de empaquetamiento, en sí mismo es un represor de la transcripción, que, al enrollar el DNA, lo oculta de la maquinaria celular involucrada en la transcripción, y otros procesos como la replicación y la recombinación. Adicionalmente, el nucleosoma actúa como un mediador entre el genoma y las señales del ambiente. La inducción de cambios estructurales sobre el nucleosoma es necesaria para que la remodelación de la cromatina ocurra (Turner, 2012). Existen dos formas funcionales de cromatina: la eucromatina y la heterocromatina. La eucromatina es cromatina que se caracteriza por poseer una apariencia microscópica no condensada, contener una alta densidad de genes, y estar altamente acetilada; propiedades que la hacen susceptible para la expresión génica, aunque no necesariamente es transcripcionalmente activa. Por su parte, la heterocromatina es la forma de la cromatina que microscópicamente se observa condensada, dispuesta en los bordes del núcleo, posee gran cantidad de secuencias repetitivas, baja densidad de genes, se encuentra desacetilada y es transcripcionalmente inerte. En algunos puntos del ciclo celular, la heterocromatina puede observarse en forma de cromosomas (Eissenberg y Elgin, 2014; Minarovits *et al.*, 2016; Watson *et al.*, 2004).

Para el adecuado funcionamiento de la célula y el establecimiento de su perfil de expresión génica, se requiere de la coordinación y el balance entre los estados heterocromáticos y eucromáticos. Los principales mecanismos epigenéticos responsables del establecimiento de éste balance son la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales sobre las histonas y la actividad de los ncRNA (Figura 1) (Choudhuri, 2011; Villota-Salazar *et al.*, 2016). La metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales sobre las histonas conforman lo que se ha denominado como el código epigenético, un lenguaje molecular en el cual los signos son las modificaciones covalentes sobre el DNA y las histonas; los escritores son las enzimas que catalizan estas modificaciones; los lectores son los dominios de los complejos multiproteicos encargados de su reconocimiento; el

significado es el efecto biológico, y los borradores son las proteínas encargadas de revertir los cambios enzimáticos (Cuadro 1). Las modificaciones químicas sobre el DNA y la cromatina ocurren de forma independiente, sin embargo, existen evidencias de que se encuentran relacionadas entre sí (intercomunicación), de forma que una modificación puede inducir la aparición de otra, dos modificaciones pueden ser mutuamente excluyentes u ocurrir simultáneamente (Allis *et al.*, 2007; Graff y Mansuy, 2008).

El código epigenético es la combinación de modificaciones sobre la cromatina que permiten alterar el estado de los genes, activándolos o reprimiéndolos, en un estado determinado de desarrollo o de diferenciación celular (Allis *et al.*, 2007; Richards y Elgin, 2002; Rothbart y Strahl, 2014; Turner, 2007). El desarrollo hace referencia a la secuencia de cambios morfológicos, estructurales y funcionales que ocurren durante la vida de un organismo (Waddington, 2016). El proceso de diferenciación celular es la serie de eventos ambientales, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, que dan lugar a la especialización de una célula a lo largo del tiempo, sin que se alteren las características genéticas de la misma (González-Prieto, 2003; Ruiz-Herrera y Campos-Góngora, 2012). La diferenciación celular corresponde a la identidad individual de la célula (fenotipo) representado por su patrón de activación y represión génica. Los perfiles de transcripción génica de las células son establecidos por los mecanismos de regulación epigenética y demás componentes del epigenoma (Sarkies y Sale, 2012; Turner, 2002). El DNA combinado con las características de la cromatina, la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales sobre las histonas y la organización nuclear, conforman el epigenoma. El epigenoma es el puente que conecta el genoma con el ambiente (Sarkies y Sale, 2012; Szyf, 2009; Turner, 2002).

2.1.1.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas y mejor caracterizadas en la actualidad. Es una marca heredable asociada con la represión de la transcripción y la formación de heterocromatina, que en eucariotas se encuentra sobre el carbono 5 de los residuos de citosina (Jurkowska *et al.*, 2011). La metilación del DNA se

localiza simétricamente en el caso de los mamíferos (en ambas cadenas de la hebra de DNA) y también asimétricamente en las plantas y en los hongos. Los principales blancos de metilación en los genomas eucariotas son los di nucleótidos CpG, aunque los hongos y las plantas también presentan metilación en los nucleótidos CpN y CpXpG, CpNpG, CpNpN, respectivamente (X= A, T, C o G; N= A, T o C) (Aramayo y Selker, 2013; Ito *et al.*, 2003; Law y Jacobsen, 2010; Li y Zhang, 2014; Lindroth *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2011; Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014). La distribución de 5-metilcitosina (5mC) en el genoma no es aleatoria: la heterocromatina, las regiones centroméricas y pericentroméricas, los elementos transponibles (TEs), los telómeros y las secuencias repetitivas, son regiones altamente metiladas (Chen y Li, 2006).

En mamíferos, la metilación del DNA se localiza también sobre los cuerpos de los genes, participando de su regulación. En estos organismos, el 70-80% de los sitios CpG del genoma de los tejidos somáticos, se encuentran metilados. Por otra parte, las islas CpG (regiones del genoma de al menos 550 pb de longitud, con un contenido de G-C superior al 50% y una relación de GC observada/GC esperada > 0.65) en general permanecen libres de metilación. Las islas CpG se encuentran en el 70% de las regiones promotoras de los genes humanos; cuando un promotor asociado a una isla CpG se encuentra metilado, el gen correspondiente tiende a estar silenciado. Las islas CpG están ausentes o son difícilmente detectables en los promotores de los genes de las plantas y de los hongos (Jurkowska *et al.*, 2011; Li y Zhang, 2014; Zemach y Zilberman, 2010). En las plantas la modificación se encuentra igualmente sobre los cuerpos de los genes, de forma análoga a lo que ocurre en los mamíferos. En el caso de los hongos, la metilación del DNA se restringe principalmente a transposones y a secuencias repetitivas. Particularmente en los hongos filamentosos, la metilación de la citosina participa de los mecanismos de “defensa del genoma” que limitan la expansión de segmentos genómicos repetitivos (Aramayo y Selker, 2013; Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014; Zemach y Zilberman, 2010).

La metilación del DNA se lleva a cabo por la acción de las enzimas metiltransferasas de DNA (DNMTs), las cuales catalizan la transferencia de un grupo metilo de la molécula cofactora S-adenosil L-metionina (SAM), al residuo de citosina, para formar 5-metilcitosina (5mC). En animales vertebrados, las enzimas DNMT1, DNMT3a y

DNMT3b, son las proteínas más importantes para el establecimiento y mantenimiento de esta impronta epigenética. DNMT1 es una metiltransferasa de mantenimiento que es específica de di nucleótidos CpG y DNA hemimetilado (DNA metilado en una sola de sus cadenas). DNMT3a y DNMT3b son las enzimas encargadas de la localización de 5mCs tejido-específicas en estadios tempranos del desarrollo embrionario, cuando el genoma se encuentra desprovisto de marcas, lo que constituye uno de los eventos determinantes de la diferenciación celular en estos organismos (Jurkowska *et al.*, 2011; Li y Zhang, 2014). Luego del establecimiento de los patrones de metilación del DNA en las células, su herencia ocurre de forma semiconservativa a lo largo de las divisiones celulares, por acción de DNMT1 durante la replicación. La metilación del DNA está implicada en fenómenos como la inactivación del cromosoma X en las hembras de los mamíferos y el establecimiento de la impronta génica parental, por la cual uno de los dos alelos de un gen heredados de los padres es inactivado selectivamente (Choudhuri, 2011). En las plantas y en los hongos también existen enzimas que cumplen con las funciones de establecimiento y mantenimiento de la marca, de hecho todas las metiltransferasas de histonas de 5mC pertenecen a una misma superfamilia enzimática que se distribuye a lo largo de bacterias, arqueas y eucariotas (Goll y Bestor, 2005; Zemach y Zilberman, 2010).

Existen tres mecanismos básicos a través de los cuales la metilación del DNA reprime la transcripción de los genes: la inhibición de la unión de factores de transcripción a secuencias reguladoras, el acceso de proteínas de unión a citosinas metiladas (MBPs) que bloquean el acoplamiento de factores de transcripción al DNA, y la formación de complejos entre MBPs y correpresores que condensan la cromatina (Attwood *et al.*, 2002). Las proteínas de la familia MBD son represores transcripcionales que cumplen una función muy importante en la coordinación de la intercomunicación entre la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales sobre las histonas, para la obtención de los programas transcripcionales de las células. Adicionalmente a la familia de proteínas MBD, existen otros lectores de la metilación del DNA como las familias Kaiso (vertebrados) y con dominio SRA (plantas) (Du *et al.*, 2015b). Aparentemente no existen genes para proteínas MBD en los genomas de las arqueas, los protozoos y los hongos (Hung y Shen, 2003).

La desmetilación del DNA puede ocurrir de forma pasiva o activa. El mecanismo pasivo implica fallas en la actividad de DNMT1 en la restauración de la metilación simétrica durante la división celular, de forma que la modificación se diluye con las replicaciones sucesivas del DNA (Chen y Riggs, 2011). Por su parte, la desmetilación por vía enzimática está a cargo de las proteínas deoxigenasas TET (Ten eleven translocation), denominadas TET1, TET2 y TET3, las cuales catalizan la oxidación sucesiva de 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). El cambio de una citosina modificada, por una sin marcas, se lleva a cabo posiblemente a través de la ruta TET/ TDG (glicosilasa de timina-DNA) / BER (reparación por escisión de base). TDG reconoce las bases 5fC y 5caC y estas son removidas. A continuación, el sitio abásico es restaurado por BER y de esta forma se restaura la citosina sin modificar (Rasmussen y Helin, 2016). Otro mecanismo posible es la deaminación de 5mC a timina y posterior reparación por BER. En plantas la remoción de 5mC ocurre directamente por la actividad de las glicosilasas de la familia DME/ROS1 acoplada a reparación por BER (Chen y Riggs, 2011). En los hongos, recientemente se caracterizó bioquímicamente una proteína homóloga a TET en *Coprinopsis cinerea* (Zhang *et al.*, 2014).

2.1.1.2 Modificaciones postraduccionales sobre las histonas

Las modificaciones postraduccionales sobre las histonas ocurren en el marco del código de las histonas, un patrón reversible de modificaciones químicas, enzimáticas, sobre los extremos amino y carboxilo terminales de las histonas (colas), que es reconocido por complejos multiproteicos que ejecutan cambios sobre la cromatina para la activación o la represión de los genes (Jenuwein y Allis, 2001; Strahl y Allis, 2000; Turner, 2000). Las principales modificaciones covalentes sobre las histonas que se han reportado son la acetilación, metilación, fosforilación, ADP-ribosilación, ubiquitilación, sumoilación, isomerización, citrulinación, hidroxilación y glicosilación (Oki *et al.*, 2007; Tollefsbol, 2011; Villota-Salazar *et al.*, 2016). Algunas de estas modificaciones también se pueden localizar en el pliegue y en el dominio globular de las histonas. La acetilación y la metilación de las histonas son las marcas más estudiadas en el contexto de los procesos

de regulación génica, establecimiento de la estructura de la cromatina, replicación y reparación del DNA (Rothbart y Strahl, 2014). En general, existen tres mecanismos a través de los cuales las marcas epigenéticas operan sobre la cromatina, para el control de la expresión génica: 1) la pérdida del contacto entre nucleosomas adyacentes, o entre nucleosomas y el DNA, por inducción de cambio de carga (efecto en *cis*); 2) la interferencia en la unión de factores de transcripción debida al acoplamiento de las proteínas que reconocen las marcas en la cromatina, y 3) el reclutamiento de complejos proteicos efectores específicos para cada tipo de modificación (efectos *trans*) (Allis *et al.*, 2007).

2.1.1.2.1 Acetilación

La acetilación es una modificación activadora de la transcripción que ocurre específicamente en la posición N-epsilon de los residuos de lisina ubicados en las colas de las cuatro histonas, por acción de las enzimas acetiltransferasas de histonas (HATs), las cuales transfieren el grupo acetilo a partir del donador acetil-CoA (Choudhuri *et al.*, 2010). La acetilación neutraliza la carga positiva de las histonas disminuyendo su afinidad por el DNA, alterando la configuración de la cromatina y propiciando, en su conjunto, la accesibilidad a los genes para el proceso de transcripción (Allis *et al.*, 2007). Las HATs actúan como subunidades catalíticas de complejos multiproteicos que pueden ser reclutados a blancos de regulación específicos, o actuar de forma general a lo largo del genoma. En los eucariotas, las HATs se clasifican en 8 grupos: Gcn5/PCAF, Hat1, Hpa2/Hpa3, TafII250, coactivadores de receptores nucleares, Elp3, CBP/p300 y MYST. Estos grupos evidencian un dominio HAT conservado con marcas específicas características de cada grupo. Las diferencias en los dominios localizados en las regiones amino y carboxilo terminales entre los grupos, también son fundamentales para su clasificación. La familia GNAT contiene los subgrupos enzimáticos PCAF y Gcn5 (Murcia-Garzón, 2016).

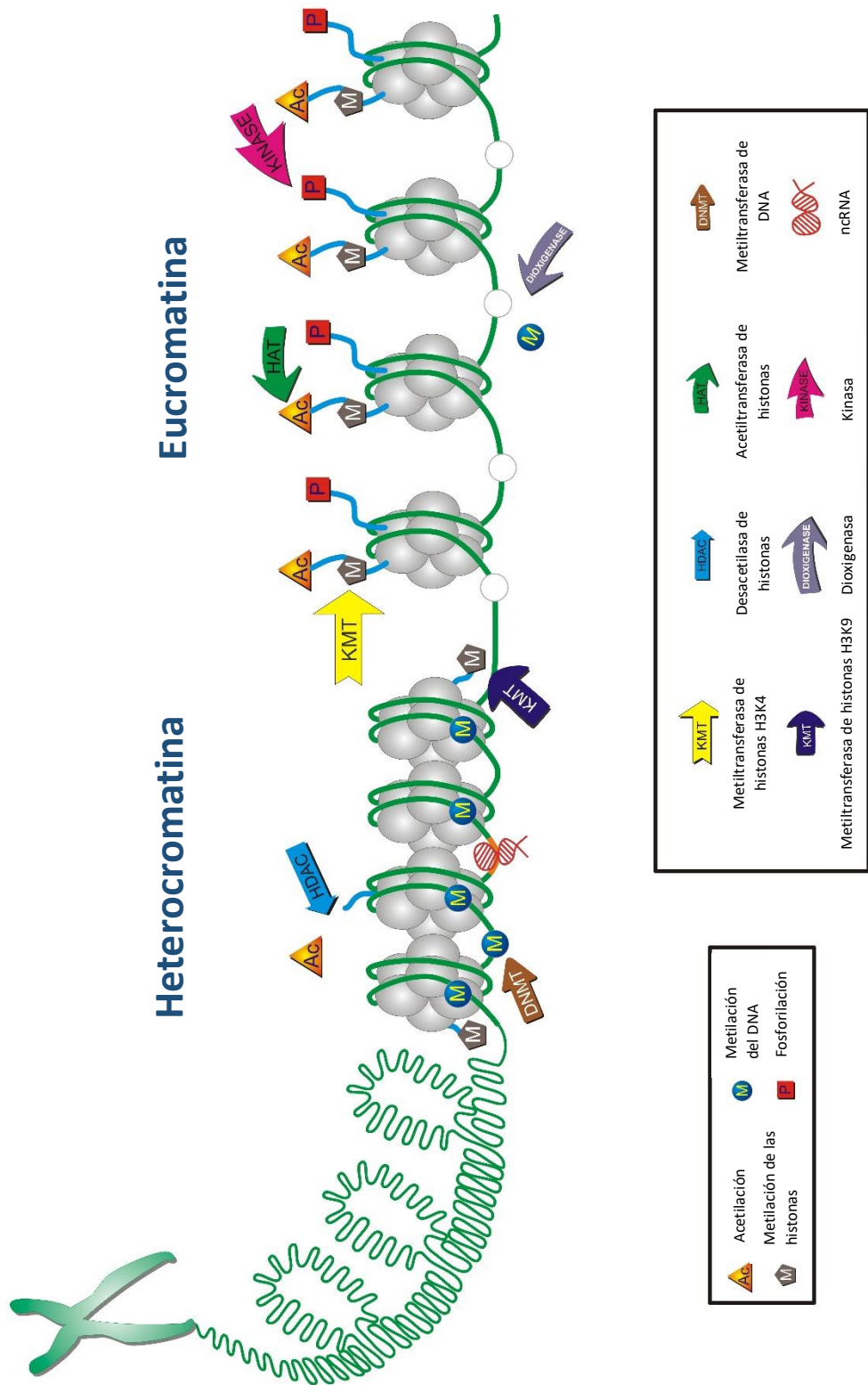


Figura 1. Cromatina y modificaciones epigenéticas sobre el DNA y las histonas. Modificado de: Villota-Salazar *et al.*, 2016.

Cuadro 1. El código epigenético

| Signos | Escritores | Marcas | Lectores | Significado | Borradores |
|---------------------------|--------------|---|---|--------------------------|------------------------------------|
| Metilación del DNA | DNMTs | 5 metil-citosina | MBD Kaiso SRA | Represión | Deoxigenasas (TET) Glicosilasas |
| Acetilación | HAT | H2A: K5, K9, K13 H2B: K5, K12, K15, K20 H3: K9, K14, K18, K23, K56 H4: K5, K8, K13, K16 | Bromodominio DBD DPF Doble PH Tandem PHD Tandem bromo Bromo 2 | Activación | HDAC |
| Metilación | KMTs y PRMTs | H2A: R3, R11, R29, R42, R71, R88, R96 H2B: R29, R31, R33, R72, R79, R99 H3: K4, K9, K36, K27, K79 H3: R2, R8, R17, R23, R26, R42, R63, R83, R128, R134 H4: K20 H4: R3, R17, R19, R23, R35, R55, R67, R92 | Cromodominio Tudor PHD MBT WD40 PWWP zf-CW ADD TTD DCD | Activación/ Represión | KDM1/IMJC Deiminasas |
| Fosforilación | Cinasas | H3: T3 H3: S10, S28 H3: Y41 | 14-3-3 BIR Tandem BRCT | Activación | Fosfatasa |
| Ubiquitinación | E1-E2-E3 | H2B: K120, H2A: K119 H2B: K123 H2A: K126 H2B: K6, K7 H4: K5, K8, K12, K16, K20 | ----- | Activación Represión | Ubiquitin-proteasas |
| Sumoilación | E1-E2-E3 | | ----- | Represión | Isopeptidasas |

Fuente: Cruickshank y Besant, 2010; Oki *et al.*, 2007; Tollesbol, 2011; Di Lorenzo y Bedford, 2011; Yun *et al.*, 2011; Du *et al.* 2015; Rasmussen y Helin, 2016; Chen y Riggs, 2011; Musselman *et al.*, 2012.

El reconocimiento de los aminoácidos de lisina acetilados se lleva a cabo a través proteínas que poseen regiones denominadas bromodominios (dominios proteicos evolutivamente conservados), dichas regiones están presentes en muchas HATs, lo cual les permite mantener su presencia y perpetuar su unión en genes o regiones con actividad transcripcional. El reconocimiento de la acetilación de la lisina por bromodominios es el que permite la ocurrencia de los eventos moleculares subsecuentes (reclutamiento de proteínas efectoras) que ocasionan la descompactación de la cromatina. Adicionalmente, las lisinas acetiladas proporcionan sitios de unión para proteínas involucradas en la activación génica, tales como los factores de transcripción (Allis *et al.*, 2007; Shahbazian y Grunstein, 2007).

Las enzimas encargadas de desacetilar los residuos de lisina y por lo tanto de favorecer la represión génica y la formación de heterocromatina, son las desacetilasas de histonas (HDACs). Estas proteínas y las HATs son las responsables del mantenimiento del balance de la acetilación en la cromatina. Las HDACs pertenecen a una superfamilia antigua de proteínas que se distribuyen entre animales, plantas, hongos, eubacterias y arqueobacterias (Leipe y Landsman, 1997). Estas proteínas se clasifican en tres familias: las HDACs clásicas (Clases I, IIa, IIb y IV), las sirtuinas (Clase III, SIR 1-7), y las enzimas tipo HD2. Estas últimas no están presentes en los hongos o los animales y son exclusivas de las plantas. En los hongos se encuentran las HDACs clásicas RPD3, HOS1 y HOS2 en la clase I, y HDA1 y HOS3 en la clase II. No existen miembros de la clase IV. En eubacterias se encuentran miembros de todas las clases de HDACs. Se ha determinado que las HDACs clase I, II y IV, precedieron la evolución de las proteínas histonas. Al igual que las HATs, las HDACs no actúan de forma individual, sino como parte de complejos multiproteicos que participan en las rutas de regulación de la expresión de los genes (Aquea *et al.*, 2010; Brosch *et al.*, 2008; Chang y Guarente, 2014; Gregoretto *et al.*, 2004; Haberland *et al.*, 2009; Hildmann *et al.*, 2007; Murcia-Garzón, 2016).

Uno de los complejos de HDACs más importantes en eucariotas es el de Sin3/HDACs. La proteína Sin3 es un co-represor de la transcripción altamente conservado que hace parte de los complejos de desacetilasas de histonas encargados del silenciamiento génico, a través de la compactación de la cromatina. Sin3 actúa como una proteína “andamio” que

recluta proteínas HDACs, otras proteínas que modifican la cromatina, proteínas de unión al DNA y factores de transcripción, hacia los promotores de los genes blanco. Los estudios de mutantes en *SIN3* han confirmado su participación en procesos biológicos importantes, tales como, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, senescencia, regulación de rutas metabólicas y del ciclo celular. Existen sub-grupos del complejo Sin3/HDACs. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, se encuentran los complejos Rpd3L y Rpd3S, los cuales poseen tanto subunidades comunes, como específicas, así como mecanismos de represión particulares. En este hongo, Sin3 es un regulador negativo de la endonucleasa HO, la cual participa del proceso de cambio de tipo sexual homotálico en el organismo. En *S. pombe* existen tres homólogos de Sin3 denominados Pst1, Pst2 y Pst3. Pst1 y Pst2 forman dos complejos diferentes que operan de forma similar a Rpd3L y Rpd3S (Chaubal y Pile, 2018; Kadamb *et al.*, 2013).

2.1.1.2.2 Metilación

La metilación de las histonas es una modificación post-traducciona que se localiza principalmente sobre las colas de las histonas H3 y H4 e involucra la transferencia de un grupo metilo del donador S-adenosil metionina (SAM) a los residuos de arginina y lisina. A diferencia de la acetilación, la metilación no altera directamente la estructura de la cromatina, pero si sus propiedades hidrofóbicas y estéricas. La metilación de las histonas es una modificación activadora o represora de la transcripción, de acuerdo a la posición del aminoácido que se metila. Las enzimas encargadas de catalizar esta reacción se denominan metiltransferasas de lisina (HKMTs, **H**istone **L**ysine **M**ethyl**T**ransferases) y metiltransferasas de arginina (PRMTs, **P**rotein **A**rginine **M**ethyl**T**ransferases) (Cruickshank *et al.*, 2010; Upadhyay y Cheng, 2011). En el caso de la lisina, se han descrito tres estados posibles de metilación: mono, di y trimetilación; mientras para la arginina únicamente dos: mono y dimetilación, ésta última puede ser simétrica o asimétrica (Allis *et al.*, 2007; Di Lorenzo y Bedford, 2011). Las HKMTs se clasifican en dos familias, una con dominio SET, conformada por las subfamilias de proteínas SET1, SET2, SET7, SET8, SUV39, SUV40, EZ y RIZ; y la familia DOT1, que alberga proteínas

con dominio catalítico que lleva el mismo nombre (Murcia-Garzón, 2016). En hongos se han reportado miembros para SET1, SET2, SUV39, EZ, SETD8/Set9 y DOT1 (Brosch *et al.*, 2008). Los sitios de metilación más estudiados son H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 y H4K20 (Cuadro 2). La metilación de la lisina es fundamental en procesos como la formación de heterocromatina, silenciamiento transcripcional, control del ciclo celular, reparación del DNA, inactivación del cromosoma X en mamíferos, impronta genómica parental, silenciamiento de genes homeóticos y activación transcripcional (Martin y Zhang, 2005).

Por su parte, existe una familia de metiltransferasas de arginina denominada PRMT, a la cual pertenecen 9 subfamilias, PRMT1-9. Las metiltransferasas de arginina se agrupan en tres categorías de acuerdo a su actividad catalítica: tipo 1, PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6 y PRMT8; tipo 2, PRMT5 y PRMT9; y tipo 3, PRMT7. Las proteínas tipo 1 y 2 llevan a cabo la formación de monometilarginina (MMA) como un intermediario para el establecimiento de la dimetilarginina simétrica o asimétrica. Adicionalmente a las histonas, pueden modificar otras proteínas involucradas en los procesos de transcripción, señalización celular, traducción de mRNA, señalización del daño del DNA, estabilidad de proteínas y *splicing*. La proteína tipo 3 cataliza únicamente la formación de MMA y su único sustrato conocido son las histonas. Las proteínas de la familia PRMT depositan marcas activadoras como H4R3me2a, H3R2me2s, H3R8me2a, H3R17me2a, H3R26me2a, H3R42me2a y marcas represoras como H3R2me2a, H3R8me2s, H4R3me2s y H2AR29me2a (Blanc y Richard, 2017; Jahan y Davie, 2015; Litt *et al.*, 2009). En los hongos se han identificado miembros para las subfamilias PRMT1, PRMT3, PRMT4 y PRMT5 (Brosch *et al.*, 2008).

Los principales lectores de las lisinas metiladas son: cromodominio, tudor, WD40, PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) y PHD (homeodominio de planta). Otros dominios lectores son ADD (ATRXDNMT3-DNMT3L), anquirina, BAH (bromo-adjacent homology), DCD (doble cromodominio), MBT (malignant brain tumor), TTD (dominio tudor en tándem) y zf-CW (zinc finger CW). Los lectores de la metilarginina son: tudor, WD40 y ADD (Aravind *et al.*, 2011; Gayatri y Bedford, 2014; Musselman *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2011). Uno de los lectores más importantes de la metilación de la lisina es HP1 (*Heterochromatin protein*

1), una proteína con cromodominio que posee homólogos desde las levaduras hasta los humanos, que participa del silenciamiento génico mediado por heterocromatina. HP1 posee hacia su extremo N-terminal un cromodominio que le permite la unión directa con H3K9me, así como otros dominios que permiten su dimerización y la interacción con otras proteínas, el DNA y el RNA (Zeng *et al.*, 2010). Otro lector importante es la proteína Chd1 (*Chromodomain helicase DNA-binding protein 1*), un remodelador de la cromatina que utiliza ATP para el ensamblaje, movimiento, espaciado y remoción de los nucleosoma del DNA. Chd1 es una proteína conservada a lo largo de los eucariotas que tiene un cromodominio doble de unión específica al residuo H3K4 metilado, marca asociada con la activación de la transcripción (Ryan *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Familias de metiltransferasas de histonas en hongos, marcas asociadas y efectos sobre la transcripción génica.

| Nombre | Marca | Efecto |
|--------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Suv39/KMT1 | H3K9me2 H3K9me3 | Represión |
| Set1/KMT2 | H3K4me1 H3K4me2 H3K4me3 | Activación |
| Set2/KMT3 | H3K36me3 | Activación |
| Ash/KMT2H | H3K36me2 | Activación |
| Dot1/KMT4 | H3K79me3 | Activación |
| Set9/KMT5 | H4K20me3 | Represión |
| EZ/KMT6 | H3K27me3 | Represión |
| Set6/AshR | Desconocida | Desconocido |
| PRMT1 | H4R3me2a | Activación / Represión |
| PRMT3 | Desconocida | Desconocido |
| PRMT4/CARM1 | H3R2me2a H3R17me2a H3R26me2a | Activación |
| PRMT5 | H2AR3me2s H4R3me2s H3R8me2s | Represión |

Fuente: Litt *et al.*, 2009; Aravind *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Gayatri y Bedford, 2014; Jahan y Davie, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Murcia-Garzón, 2016; Freitag, 2017.

Los borradores de la metilación de la lisina se conocen como desmetilasas de lisina, de las cuales se han identificado dos familias, KDM1/LSD y JmjC (D'Oto *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015a). La desmetilación de la arginina es mediada por la proteína peptidil arginina deiminasa 4 (PADI4), la cual convierte a la arginina en citrulina, sin embargo, recientemente se demostró que un subgrupo de proteínas JmjC pueden llevar a cabo la reversión de la metilación sin el cambio del residuo de arginina (D'Oto *et al.*, 2016; Walport *et al.*, 2016).

2.1.2 Estudios en hongos

Los hongos se consideran excelentes modelos para el estudio de los fenómenos epigenéticos. En los últimos años estos organismos han proporcionado información muy valiosa a cerca de la estructura y función de la cromatina.

2.1.2.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA en los hongos representa un mecanismo de silenciamiento de la expresión génica, que se encuentra principalmente asociado con los sistemas de defensa del genoma. Estos sistemas se han desarrollado como una estrategia de protección contra los efectos nocivos de la acumulación de secuencias repetitivas y TEs (Smith *et al.*, 2012). Los genes que codifican para metiltransferasas del DNA no se encuentran presentes en todos los taxones, por lo cual se considera que la metilación del DNA no es una marca común entre los hongos. Ascomicetos como *S. cerevisiae* y *S. pombe*; Basidiomicetos como *Malassezia globosa* y *Wallemia sebi*; y Zigomicetos como *Mucor circinelloides* y *Rhizopus oryzae*, entre otros, no metilan el DNA (Freitag, 2017; Huang *et al.*, 2016; Zemach y Zilberman, 2010). La pérdida de la capacidad para metilar el DNA se ha observado en otros organismos como *D. melanogaster*, *C. elegans* y varias especies de algas verdes (Zemach y Zilberman, 2010).

Pese a lo anterior, la mayoría de los hongos filamentosos poseen metiltransferasas de DNA. (Zemach y Zilberman, 2010). De acuerdo con Huang *et al.* (2016), estas enzimas se clasifican en dos familias principales, Dnmt1 y Rad8. Dentro de la familia Dnmt1 se encuentran las subfamilias Dnmt1/Masc2, Dim-2 y Masc1/RID (Dnmt4) (Huang *et al.*, 2016). La subfamilia Dnmt1/Masc2 está presente en ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos, su representante más conocido es Masc2 de *Ascobolus immersus*. La subfamilia Dim-2 agrupa metiltransferasas de DNA que llevan a cabo tanto la metilación *de novo*, como la de mantenimiento, su principal representante es Dim-2 de *N. crassa*. Finalmente, la subfamilia Masc1/RID es específica de hongos filamentosos de Pezizomycotina, sus principales representantes son Masc1 y RID de *A. immersus* y *N. crassa*, respectivamente (Smith *et al.*, 2012).

Recientemente se reportaron dos nuevas familias de metiltransferasas de DNA las cuales fueron denominadas Dnmt5 y Rad8. Dnmt5 se encuentra presente en los hongos, así como a lo largo de otros organismos. Dnmt5 está en clados en los cuales se pensaba no existía metilación del DNA como *Aspergillus*, *Histoplasma* y *Coccidioides*; así como en hongos en los que se desconocía cual enzima llevaba a cabo esta actividad, el caso de *C. neoformans* (Freitag, 2017). De acuerdo a las evidencias, se considera que junto con la familia Dnmt1, Dnmt5 estuvo presente en el último ancestro común de los eucariotas. Dnmt5 ha suplido la pérdida evolutiva de Dnmt1 en varias especies (Huff y Zilberman, 2014). Por su parte, la familia Rad8 agrupa metiltransferasa de histonas *de novo* que se encuentran exclusivamente en hongos basidiomicetos (Huang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). En los genomas de los hongos no se encuentran homólogos de Dnmt3 o metiltransferasas *de novo* de los mamíferos. Su función recae probablemente sobre las proteínas de las familias Dim-2 y Rad8 (Smith *et al.*, 2012).

En general, los hongos presentan bajos niveles de metilación del DNA, siendo estos apenas detectables (Li *et al.*, 2018). *N. crassa* es el organismo del cual se ha obtenido la mayor cantidad de conocimiento acerca de la metilación del DNA en los hongos, el 1.5% de las citosinas de su genoma se encuentran metiladas. *N. crassa* posee tres sistemas de silenciamiento epigenético, los cuales operan en diferentes estadios de su ciclo de vida: RIP (Mutación puntal inducida por repetición), silenciamiento génico postranscripcional

guiado por RNA pequeños (Quelling) y silenciamiento meiótico por DNA no emparejado. De estos tres, se ha demostrado la participación de la metilación del DNA en RIP, actuando como un “sistema inmune genético” (Aramayo y Selker, 2013; Zemach y Zilberman, 2010). Otros sistemas de defensa del genoma en hongos son SCANR (Procesos de vigilancia de RNA cotranscripcional) y SIS (Silenciamiento inducido por sexo), los cuales se han descrito en *C. neoformans* (Gladyshev, 2017).

RIP fue el primer mecanismo de defensa del genoma reportado en hongos. RIP detecta y muta secuencias de DNA duplicadas, durante el ciclo sexual (en el tejido ascogónico dicariótico especializado). Después de la fertilización, RIP detecta las secuencias repetidas e induce mutaciones de C: G por T: A, en ambas copias. Aproximadamente el 30% de las bases G:C de las secuencias duplicadas son mutadas. Luego de la meiosis, las citosinas restantes en los puntos de mutación son sujetas a metilación por acción de la proteína RID, lo cual lleva al silenciamiento irreversible. La mayor parte de las secuencias silenciadas por RIP corresponden a reliquias de transposones. En *A. immersus* ocurre un proceso similar que no involucra la inducción de mutaciones, el cual es denominado MIP (Metilación inducida premeioticamente). Además de *N. crassa*, también llevan a cabo RIP *Podospora anserina*, *Magnaporthe grisea*, *Leptosphaeria maculans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* y *A. nidulans*. En otros hongos existen homólogos de RID pero no se ha demostrado que lleven a cabo RIP (Galagan y Selker, 2004).

Dentro de las levaduras que llevan cabo la metilación del DNA se encuentran *Candida albicans* y *C. neoformans*. A diferencia de *N. crassa*, en *C. albicans* ésta marca epigenética se encuentra principalmente localizada en los cuerpos de los genes, por lo que está asociada con el silenciamiento de aquellos que participan en la transición dimórfica, u otros cambios fenotípicos. Debido a lo anterior, se presume que la metilación del DNA en *C. albicans* está involucrada en la regulación génica. Su función en el control de secuencias repetitivas y TEs está reducida o ausente, lo que ocasiona inestabilidades cromosomales (Mishra *et al.*, 2011).

Aún no es claro por qué algunos organismos han perdido la capacidad para metilar el DNA, tampoco se conocen las razones por las cuales la marca se mantiene invariablemente en el genoma de otros. Se considera que una de las principales funciones

de la metilación del DNA en los eucariotas es garantizar el "sexo seguro", en tanto la principal vía de expansión de los TEs es el sexo. Para los organismos que son principalmente asexuales, la metilación del DNA representa un mecanismo del que podrían prescindir y, por el contrario, la propagación de elementos móviles y secuencias repetidas sería una fuente de variabilidad potencialmente benéfica. Sin embargo, en el caso de las plantas y de los animales, la metilación del DNA no solo se limita al control de TEs, la marca también se localiza en los cuerpos de los genes y ha adquirido una función en la regulación de los procesos de desarrollo. Esto último, es algo que aún no se encuentra completamente demostrado en organismos como los hongos. Lo anterior, hace poco probable que las plantas y los animales puedan deshacerse fácilmente de este mecanismo, su ausencia probablemente los haría inviables. Otras especies han solventado la ausencia de la metilación del DNA a través de los sistemas de silenciamiento por iRNA, tanto para el control de elementos móviles, como para la regulación genética (epigenética) (Zemach y Zilberman, 2010).

El primer metiloma de DNA reportado para un hongo fitopatógeno fue el de *Magnaporthe oryzae*. Este análisis permitió demostrar que el tejido con la mayor cantidad de citosinas metiladas es el micelio, y que una gran cantidad estas marcas desaparecen en la conidia y el apresorio, posiblemente a través del proceso de desmetilación pasiva. El micelio es un tejido que puede diferenciarse en cualquier tipo celular, sin embargo, la conidia únicamente puede desarrollarse como micelio vegetativo o apresorio después de la germinación. El apresorio, por su parte, se forma únicamente con el propósito de penetrar al hospedero. Lo anterior indica que el potencial de desarrollo de los tejidos del hongo puede ser restringido a través de la pérdida de sitios de metilación existentes, pero seguramente también por la aparición *de novo* de otros sitios. Lo anterior podría indicar que la metilación del DNA en los hongos está especializándose, de forma análoga a lo que ocurre en los mamíferos (Jeon *et al.*, 2015). En el micelio de *M. oryzae* aproximadamente el 0.22% de los sitios de citosina del genoma están metilados, especialmente en los lugares en los que abundan TEs. Sin embargo, cerca del 20% de la metilación del DNA se encontró en sitios que no corresponden a elementos móviles, siendo esta una evidencia de que en el genoma de los hongos también se metilan los cuerpos de los genes. La interrupción de las DNMTasas de *M. oryzae* causa defectos en el desarrollo normal, como

la disminución de la reproducción asexual. Dim-2 de *M. oryzae* es responsable por el 91% de la metilación de la citosina tanto simétrica, como asimétrica; RID se encarga de la metilación restante, aunque se desconoce si lleva a cabo esta actividad como parte del proceso de RIP (Jeon *et al.*, 2015).

En *A. flavus*, la interrupción del gen que codifica para la metiltransferasa de DNA DnmtA, disminuye la producción de conidias debido a la reducción del número de conidióforos. De igual forma, reduce la biosíntesis de aflatoxinas e incrementa 4 veces la producción de esclerocios. Durante la colonización de semillas de cacahuete y maíz, la cepa mutante despliega una mayor cantidad de micelio y de conidias, respecto a la cepa silvestre. DnmtA no está involucrada en la resistencia al estrés osmótico o de la pared celular. Un gen ortólogo en el mismo organismo, denominado *dnmtA*, está involucrado en la conidiación, síntesis de esclerocios, resistencia al estrés oxidativo y producción de aflatoxinas (Yang *et al.*, 2016; Zhi *et al.*, 2017).

2.1.2.2 Modificaciones postraduccionales sobre las histonas

Las modificaciones postraduccionales sobre las histonas en los hongos se han estudiado principalmente en *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *S. pombe* y *N. crassa*. Como ya se mencionó, *S. cerevisiae* no metila el DNA y carece de sistema de iRNA, debido a lo anterior, las modificaciones postraduccionales sobre las histonas llevan a cabo todos los procesos de regulación epigenética en el organismo. Es el caso del cambio de tipo sexual y el silenciamiento telomérico. Los loci de apareamiento *HML α* , *MAT* y *HMR α* se encuentran localizados en el cromosoma III. *HML α* y *HMR α* son reprimidos por la acción de dos silenciadores (E: esencial; I: importante) que los flanquean. Los loci de apareamiento únicamente pueden estar activos cuando se copian y se integran en el locus *MAT*, el cual carece de silenciadores. El proceso de silenciamiento ocurre debido a que los silenciadores reclutan a la proteína Sir1 por medio de las proteínas ORC (Complejo de reconocimiento de origen). Sir1 a su vez recluta el complejo de desacetilasas de histonas Sir2, Sir3 y Sir4. Sir2 desacetila las lisinas de las terminaciones de las histonas H3 y H4, mientras Sir3 y Sir4 se unen al nucleosoma y estabilizan su posición para la compactación. Sir2 continua

la desacetilación del siguiente nucleosoma y el silenciamiento se extiende progresivamente de forma bidireccional. La heterocromatina en los loci de apareamiento es notablemente más consensada que la encontrada en los telómeros, para la cual se utiliza un mecanismo de formación similar, basado igualmente en el complejo de proteínas Sir (Grunstein y Gasser, 2013; Haber, 2012).

En *S. cerevisiae*, las mutaciones de los genes *SIR3* y *SIR4* provocan la disminución de la fase de vida haploide, sin embargo, las mutaciones en *SIR2* producen un efecto mucho más severo en el tiempo de vida (envejecimiento), debido a la incapacidad adicional de suprimir la generación de círculos de DNA ribosomal extracromosomal (ERCs). Los genes *SIR* están involucrados en la reparación del DNA y la recombinación homóloga (Kaeberlein *et al.*, 1999). *SIR2* también está involucrado en la expansión del tiempo de vida de esta levadura al favorecer el fenómeno de restricción calórica (Howitz *et al.*, 2003).

El fenómeno epigenético de cambio blanco (células incapaces de aparearse) - opaco (células con capacidad de apareamiento) en *C. albicans*, por el cual células con idéntico material genético difieren en morfología celular, forma colonial, perfil de expresión genética y virulencia; está controlado por proteínas que modifican las histonas, tales como Set1, Hda1, Rpd3 y Hos2, entre otras. Las fases opaca y blanca son heredables a lo largo de muchas generaciones, pero también son reversibles (Hnisz *et al.*, 2009).

En *S. pombe* la formación de heterocromatina requiere de las proteínas que modifican las histonas, así como de la maquinaria del iRNA, debido a que este organismo tampoco metila el DNA. Las regiones de heterocromatina en *S. pombe* se encuentran en los loci de apareamiento (de forma similar a lo descrito en *S. cerevisiae*), la región del rDNA, los telómeros y los centrómeros. La formación de heterocromatina en los centrómeros diferencia a este organismo de *S. cerevisiae*. Las regiones centroméricas en *S. pombe* son ricas en lisinas di y trimetiladas en H3K9 (H3K9me2 y H3H9me3), las cuales son marcas de represión reconocidas. El proceso de esparcimiento de la heterocromatina en dichas regiones ocurre por acción de las proteínas HDACs, HKMTs y HP1. Las enzimas HDACs desacetilan las lisinas en las áreas de silenciamiento, mientras las proteínas HKMTs llevan a cabo la metilación de H3K9 en las repeticiones centroméricas, modificaciones que

posteriormente son reconocidas por la proteína HP1 que media la formación de heterocromatina (Allshire y Ekwall, 2015).

Por su parte, *N. crassa* es el organismo que permitió demostrar por primera vez la intercomunicación entre la metilación de las histonas y la metilación del DNA. La mutación del gen *dim-5*, el cual codifica para una metiltransferasa de histonas que trimetila H3K9, ocasiona la pérdida completa de la capacidad de este organismo para metilar el DNA. De igual forma, la inhibición de las proteínas HDACs ocasiona la desmetilación selectiva del genoma del hongo (Selker, 1998; Tamaru y Selker, 2001; Tamaru *et al.*, 2003). En *C. neoformans* las regiones del genoma con presencia de 5mC coinciden con las regiones de localización de H3K9me; la interrupción del gen encargado de colocar esta marca ocasiona la disminución de los niveles de 5mC en el genoma del hongo (Catania *et al.*, 2017). Se considera que la metilación del DNA es precedida por la metilación de las histonas, lo cual indica que la metilación del DNA representa un estado heterocromático a largo término (Jeon *et al.*, 2015).

La distribución de los genes que codifican para HKMTs determinada a partir de la comparación filogenética de varios genomas fúngicos indica que la metilación de H3K4, H3K9, H3K27 y H3K36, es una habilidad muy antigua. No obstante, no todos los hongos metilan todos los residuos posibles de la histona H3. *S. cerevisiae* y *C. albicans* carecen de H3K9 y H3K27, *S. pombe* de H3K27 y especies de *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus* han perdido los genes para metilar H3K27. La pérdida de la capacidad para metilar H3K27 en combinación con la pérdida de la capacidad para metilar la citosina del DNA, es un evento frecuente en los hongos (Freitag, 2017).

2.1.2.2.1 Acetilación

Los estudios de interrupción de los genes que están involucrados en la acetilación y desacetilación de las histonas en diversos hongos, han demostrado la importancia de estos en los procesos de crecimiento, desarrollo, reproducción y metabolismo, así como en la virulencia.

En *S. cerevisiae*, la disrupción del gen que codifica para la desacetilasa de histonas Rpd3, ocasiona el incremento de la sensibilidad de la mutante al etidio, cicloheximida y acriflavina. A concentraciones altas de fosfato, la mutante produce más fosfatasa ácida, siendo su actividad tres veces mayor que en la cepa silvestre. Adicionalmente, la capacidad para el apareamiento esta disminuida debido a un defecto en la producción de factor α . No se produce esporulación (Vidal y Gaber, 1991). La mutación ocasiona el incremento de la acetilación de H4K12 en la cromatina adyacente a los orígenes de replicación (ori) y se altera la fase S del ciclo celular, promoviendo la rápida replicación del genoma ante una activación más rápida de los ori (Vogelauer *et al.*, 2002). El ortólogo de *RPD3* en *S. pombe*, denominado *phd1+*, también es necesario para la formación de esporas. *phd1+* está involucrado en el ciclo celular meiótico de éste hongo (Kim *et al.*, 1998).

El gen *pst1+* de *S. pombe*, un homólogo de *SIN3* de *S. cerevisiae*, tiene una función importante en la transposición de LTRs y es esencial para la viabilidad celular. En presencia de concentraciones sub-letales del inhibidor de HDACs clase I y II, tricostatina A (TSA), la cepa mutante evidencia crecimiento lento y morfología filamentosa. *Pstp1* se requiere para el mantenimiento de la forma levaduriforme. El tratamiento de la cepa silvestre con TSA causa la pérdida del silenciamiento en los centrómeros, deslocalización de las proteínas de los centrómeros y alteraciones en la segregación cromosomal. Defectos similares se observan en la mutante de *pst1+* (Dang *et al.*, 1999).

La interrupción del gen *HDC1*, un homólogo de *HOS2* en *Cochliobolus carbonum* (patógeno del sorgo, el maíz y la manzana), ocasiona la reducción del tamaño y del número de septas de las conidias, así como la disminución de la virulencia del hongo. La cepa mutante pierde la capacidad para penetrar las hojas del maíz de forma eficiente, si bien su capacidad para formar el apresorio no está afectada. *HDC1* está implicado en la regulación de la expresión de enzimas extracelulares reprimidas por glucosa que pueden despolimerizar la pared celular de la planta, lo que explica la incapacidad de la mutante para penetrar y colonizar al hospedero. Esta cepa evidencia una capacidad de crecimiento disminuida sobre polisacáridos complejos diferentes a la glucosa y la sacarosa (Baidyaroy *et al.*, 2001).

La exposición de *C. albicans* al inhibidor tricostatina A incrementa su sensibilidad a compuestos antifúngicos que actúan sobre la síntesis del ergosterol (fluconazol, itraconazol, miconazol, terbifabina y fenpropimorfo) (Smith y Edlind, 2002). En *S. pombe*, la acetiltransferasa de histonas Gcn5 no se requiere para el crecimiento celular o proliferación del hongo en medio enriquecido, sin embargo, la mutación del gen causa alteraciones en la adaptación del hongo frente a algunas condiciones de estrés, tales como temperaturas altas y estrés osmótico (KCl y CaCl₂). Gcn5 regula un subgrupo de genes de respuesta al estrés por KCl (Johnsson *et al.*, 2006). De otra parte, en las levaduras *S. cerevisiae* y *S. kluyveri*, la ausencia de *GNC5* genera una deficiencia en el crecimiento leve, comparado con el crecimiento de las cepas silvestres. Al igual que en el caso de *S. pombe*, *S. cerevisiae* y *S. kluyveri* requieren de Gcn5 para su adaptación a condiciones de estrés osmótico por KCl y CaCl₂. En las tres especies también se observa sensibilidad incrementada a la exposición a calcofluor blanco, MnCl₂ y cafeína, pero no frente a LiCl, MgCl₂, NaCl, sorbitol y etanol. Gcn5 regula un grupo de genes de respuesta a estrés que es común en las tres levaduras, así como también grupos particulares de genes en cada especie (Xue-Franzen *et al.*, 2010). La mutante de *GCN5* en *S. cerevisiae* es incapaz de crecer apropiadamente bajo condiciones de privación de nutrientes (Georgakopoulos y Thireos, 1992).

En *Aspergillus nidulans*, la mutación del gen *HdaA*, el cual codifica para una proteína desacetilasa de histonas, genera el crecimiento reducido del hongo bajo condiciones de estrés oxidativo, debido a una producción deficiente de la enzima catalasa. Adicionalmente, la ausencia de *HdaA* activa dos grupos de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, genes que se encuentran localizados en regiones proximales a los telómeros. El incremento en la producción de metabolitos secundarios también se consigue al tratar a los hongos *Alternaria alternata* y *Penicillium expansum* con TSA; y *Cladosporium cladosporioides* y *A. niger*, con otro inhibidor de HDACs, SAHA. Las HDACs regulan en metabolismo secundario de varias especies de hongos. En *A. fumigatus* la interrupción de *HdaA* disminuye la tasa de germinación y altera el crecimiento vegetativo del hongo, modificando la morfología de la colonia y su pigmentación. La producción de gliotoxina esta disminuida, sin embargo, la virulencia de

la mutante en un modelo pulmonar murino no está afectada (Henrikson *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Shwab *et al.*, 2007; Tribus *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008).

La disrupción del gen *SIN3* en *S. cerevisiae* ocasiona hipersensibilidad a la fleomicina, compuesto que ocasiona rupturas de doble cadena en el DNA (DSBs); de igual forma genera defectos en el mecanismo de reparación del material genético denominado *nonhomologous end joining* (NHEJ). Se ha encontrado que existe hipoacetilación de H3K16 en la vecindad de sitios DSBs en el DNA. Esta hipoacetilación es mediada normalmente por Sin3p. Alteraciones similares se observan en la cepa mutante para *RPD3*, pero no para *HDA1*. La actividad del complejo Sin3p/Rpd3p es necesaria para que ocurra NHEJ de forma eficiente (Jazayeri *et al.*, 2004). Adicionalmente, la mutación de *SIN3* afecta la expresión de numerosos genes con funciones no relacionadas (Slekar y Henry, 1995); bajo esta condición, 173 genes se encuentran regulados positivamente y 269 negativamente, por lo que Sin3p no solamente actúa como un represor transcripcional. Los perfiles de expresión entre las cepas mutantes de *RPD3* y *SIN3* son similares, la función entre las proteínas correspondientes se encuentra íntimamente relacionada (Bernstein *et al.*, 2000). Sin3p se requiere para la esporulación y participa del control de la interconversión de tipo sexual de las células hijas, las cuales ante la ausencia de la proteína expresan *HO* (Sternberg *et al.*, 1987).

La mutación del gen *FTL1*, el cual codifica para una proteína miembro de un complejo de HDACs en *Fusarium graminearum*, genera la reducción de la conidiación y de los síntomas de la enfermedad del hongo sobre la planta de trigo. La mutante falla en la penetración y colonización de los tejidos del hospedero (Ding *et al.*, 2009). El tratamiento de las conidias de *M. oryzae* (patógeno del arroz) con los inhibidores de desacetilasas de histonas TSA, butirato de sodio y tricostatina C, ocasiona la inhibición de la formación del apresorio. El tratamiento con TSA produce hiperacetilación de las histonas y una disminución significativa de los síntomas de la enfermedad en la planta. A partir de las mutaciones de los genes que codifican para HDACs en este hongo, se concluyó que *HDA1* y *HOS2* son necesarias para el crecimiento vegetativo y la conidiación. *HOS2* se requiere para la formación del apresorio (Izawa *et al.*, 2009).

La cepa mutante para el gen *tig1* en *M. oryzae*, el cual pertenece a un complejo de HDAC, no es patogénica en plantas de arroz, al bloquear la diferenciación y crecimiento de las hifas invasivas. La mutante evidencia sensibilidad incrementada al estrés oxidativo y conidiogénesis defectuosa. La interrupción de *HOS2*, miembro del mismo complejo de HDACs, ocasiona un fenotipo similar en este hongo (Ding *et al.*, 2010). La interrupción del gen que codifica para Gcn5 en el patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans*, ocasiona la reducción del crecimiento del hongo a temperatura de 37 °C, así como el incremento de su sensibilidad al estrés oxidativo. Estas condiciones son propias de los hospederos que infecta. Adicionalmente, la ausencia del gen causa una reducción severa del tamaño de la capsula debido a un defecto en el acoplamiento del polisacárido, con peso molecular disminuido, a la superficie de la célula. Esta cepa es avirulenta en modelo murino. Gcn5 regula la adaptación de *C. neoformans* al hospedero (O'Meara *et al.*, 2010). Hos2 y HdaI regulan el cambio dimórfico de *C. albicans* en formas opuestas. La cepa mutante de *HOS2* posee una la capacidad incrementada de filamentar en distintos medios de crecimiento, en comparación con la cepa silvestre. Hos2 actúa como un inhibidor de la filamentación, excepto bajo condiciones de deprivación de nitrógeno, en las cuales Hos2 se requiere para la formación de filamentos. En contraste, la mutante de *HdaI* evidencia filamentación pobre o ausencia de esta. Sin3p no es esencial para la viabilidad del hongo (Zacchi *et al.*, 2010).

En este mismo organismo, la mutación del gen que codifica para la proteína Esa1, miembro de la familia de acetiltransferasas de histonas MYST; es necesaria para el inicio de la filamentación, así como para la adaptación a condiciones de estrés genotóxico, oxidativo y térmico. La cepa mutante evidencia tolerancia en el crecimiento a bajas temperaturas, estrés osmótico y estrés asociado a la pared celular. La ausencia de Sas1, otro integrante de MYST, incrementa la tolerancia del hongo a temperaturas altas y promueve la formación de filamentos a temperaturas bajas. La doble mutación genera letalidad, lo cual demuestra que Esa1 y Sas1 son redundantes para el crecimiento celular (Wang *et al.*, 2013). En *S. cerevisiae*, Esa1 es necesaria para el crecimiento, la progresión del ciclo celular, la activación transcripcional y la reparación de DSBs (Clarke *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1998).

La mutación del ortólogo de *HOS2*, *HDF1*, en *F. graminearum*, ocasiona la disminución significativa de la virulencia del patógeno y de la producción del factor de virulencia DON (deoxinivalenol); así como defectos en la reproducción sexual, conidiación y pérdida del 60% de la actividad desacetilasa (Li *et al.*, 2011). La mutación del gen que codifica para la proteína Gcn5 en *Trichoderma reesei*, causa una marcada reducción en su tasa de crecimiento y cambios morfológicos notables entre los que se encuentran, la deformación de las hifas y la pérdida de la conidiación. La síntesis de celulasa esta disminuida (Xin *et al.*, 2013). El tratamiento del fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* con TSA, produce alteraciones de la morfología colonial y del tamaño de los microesclerocios. Adicionalmente provoca la reducción de la virulencia del hongo sobre plantas de *P. vulgaris* de la variedad BAT 477 (Villota-Salazar, 2013).

La interrupción de los genes *Hda1* y *Hda2* en *F. fujikuroi* genera cepas con una marcada reducción de su virulencia, efecto que se potencia en la cepa doble mutante. La carencia de *Hda1* (homólogo de *HdaA*) ocasiona la disminución de la síntesis de metabolitos secundarios tales como giberelina, bikaverina, fusarubina y ácido fusárico. *Hda2* también es importante en la regulación de la producción de metabolitos secundarios, su mutación genera la disminución de la síntesis de giberelina, bikaverina, ácido fusárico y fusarinas. Las giberinas son necesarias para el crecimiento invasivo del hongo en la planta de arroz. *Hda4* es un gen relevante para la conidiación y el crecimiento, pero no participa del metabolismo secundario (Studt *et al.*, 2013).

En *A. nidulans* la proteína GcnE (Gcn5) es necesaria para la formación del conidióforo. En la cepa mutante para este gen no se produce la conidiación (Canovas *et al.*, 2014). Gcn5 es fundamental para el crecimiento filamentoso e invasivo del patógeno oportunista *Candida albicans*. La interrupción de *GCN5* no incrementa la sensibilidad del hongo frente a agentes que dañan el DNA, tampoco el crecimiento del organismo es afectado en respuesta a estrés genotóxico u oxidativo. Sin embargo, el crecimiento de la mutante está seriamente disminuido en presencia de Rojo Congo, compuesto que interfiere con la síntesis de glucano. Lo anterior indica que Gcn5 se requiere para la respuesta a estrés de la pared celular en el hongo. Esta cepa es avirulenta en modelo murino (Chang *et al.*, 2015). En *A. flavus* la remoción de *GcnE* inhibe el crecimiento, la esporulación asexual y

la formación de esclerocios. De igual forma genera en el hongo una mayor sensibilidad a compuestos genotóxicos y de daño a la pared celular, pero no a agentes de estrés osmótico u oxidativo. La producción de aflatoxinas está ausente y la habilidad de la mutante para colonizar las semillas del maíz se encuentra afectada por la actividad baja de la proteína lipasa (Lan *et al.*, 2016).

En *F. fujikuroi*, la interrupción de *GCN5* ocasiona defectos en el crecimiento, la conidiación y la biosíntesis de metabolitos secundarios. En este organismo, Gcn5 se requiere para la acetilación de H3K4, H3K9, H3K18 y H3K27 (Rosler *et al.*, 2016). La mutación de *GCN5* en *Beauveria bassiana*, un hongo patógeno de insectos, ocasiona una reducción del 97% de su capacidad de conidiación, así como defectos en el crecimiento colonial, resistencia disminuida de las conidias a las temperaturas altas y sensibilidad incrementada al estrés oxidativo. Gcn5 se requiere para la penetración de la cutícula de las larvas de *Galleria mellonella*, la cepa mutante no causa la muerte de las larvas bajo condiciones normales de infección (exposición tópica). Al inyectar las conidias del hongo en el haemocoel de las larvas, no se observa crecimiento fúngico en la superficie de estas, 5 días después de la infección. Gcn5 se requiere para la proliferación del hongo en el insecto (Cai *et al.*, 2018).

La mutación de 7 HDACs en *C. neoformans* demostró que estas proteínas controlan varios procesos como la termotolerancia, formación de cápsula, síntesis de melanina, actividad proteasa, mantenimiento de la integridad de la pared celular y virulencia. La interrupción de *hda1*, *clr62* y *rpd3* provocan la reducción del crecimiento del hongo en la presencia de agentes estresantes como el SDS y el calcofluor blanco. Las cepas mutantes en *hda1*, *clr62* y *hos3* presentan una reducción en la expansión de la cápsula de polisacáridos, mientras la mutante en *hos1* posee una cápsula más grande que la cepa silvestre. La mutación de *hda1* y *hos2* retrasan la producción de melanina y altera la secreción de proteasas importantes para el crecimiento, la sobrevivencia y la invasión del sistema nervioso central. Las proteínas HDACs son necesarias para la formación apropiada de la hifa de apareamiento del hongo y la completa virulencia en diferentes hospederos (Brandao *et al.*, 2018).

2.1.2.2.2 Metilación

Al igual que la acetilación y la desacetilación, la metilación de las histonas es esencial para diversos procesos de diferenciación celular y virulencia en los hongos. En *S. pombe*, las mutaciones en *swi6* (ortólogo de *HP1*) provocan una tasa alta de pérdida cromosómica por alteración de la función del centrómero. En este mismo organismo, la ausencia de *Clr4* (metiltransferasa de histonas H3K9, ortólogo de DIM-5) permite la activación de loci normalmente silenciados en los centrómeros y afecta la segregación cromosomal, favoreciendo la pérdida de cromosomas. Las cepas mutantes en los genes *swi6* y *clr4* se caracterizan por su esporulación reducida y sensibilidad a agentes que desestabilizan los microtúbulos (Allshire *et al.*, 1995; Ekwall *et al.*, 1996; Ekwall y Ruusala, 1994).

En *S. pombe*, la metilación de H3K4 promueve el mantenimiento de estados activos de la cromatina (Noma y Grewal, 2002). En *S. cerevisiae*, la proteína Set1 no es indispensable para la viabilidad del hongo, sin embargo, las células mutantes adoptan morfologías anormales y son multigemantes, sus colonias son más pequeñas y presentan retraso en el crecimiento. La ausencia de Set1 causa silenciamiento telomérico disminuido, permitiendo la activación de genes cercanos a estas regiones, así como del locus de apareamiento *HML* (Nislow *et al.*, 1997). La metilación de H3K4 por parte de Set1 determina si los complejos de remodelación de la cromatina pueden remodelar los nucleosomas de los loci de respuesta al estrés osmótico (Nadal-Ribelles *et al.*, 2015). Adicionalmente, la remoción de *SET1* produce defectos en el crecimiento ante la presencia del antifúngico Brefeldin A (BFA). Se determinó que Set1 es importante para la expresión de genes de la ruta biosintética del ergosterol (South *et al.*, 2013).

Al igual que DIM-5, la proteína HP1 es esencial para la metilación del DNA en *N. crassa*. HP1 actúa como el lector de la metilación de H3K9 y a su vez recluta la maquinaria necesaria para la metilación de la citosina. HP1 es necesaria para el crecimiento normal del hongo (Freitag *et al.*, 2004). Las regiones centroméricas de *N. crassa* son ricas en H3K9me3, la remoción de *Dim-5* y *HP1* afecta la distribución de la variante de las histonas CenH3, la cual es fundamental para la localización y conformación del centrómero (Smith *et al.*, 2011). La interrupción de Set2 en este mismo organismo

ocasiona retardo en el crecimiento, conidiación escasa y esterilidad femenina. En la mutante, la metilación de H3K36 está ausente (mono, di y trimetilación), pero la metilación del DNA no se encuentra afectada. Lo anterior indica que la metilación de H3K36 es importante para la expresión de genes involucrados en las rutas de diferenciación sexual y asexual (Adhvaryu *et al.*, 2005).

En *S. cerevisiae*, la metilación de H3K79 por parte de DOT1, es necesaria para la verificación de daños en el DNA producto de la exposición a radiación infrarroja en las fases G₁ y S del ciclo celular, pero no en las fases G₂ y M. Esta actividad es específica, debido a que no se lleva a cabo por la acción de las proteínas Set1 o Set2. La mutante en *DOT1* evidencia una carencia de sensibilidad al daño en el DNA, posiblemente mediada por la sobreexpresión de genes involucrados en la reparación del material genético (Wysocki *et al.*, 2005). De igual forma, la ausencia de *DOT1* retarda la senescencia en el hongo, en tanto la proteína normalmente participa del acortamiento telomérico (Wanat *et al.*, 2018).

En *A. nidulans* y *A. fumigatus* la ausencia del gen que codifica para la proteína CclA, miembro del complejo COMPASS que metila H3K4, genera la pérdida de las marcas H3K4me₂ y H3K4me₃, así como la activación de grupos de genes (*clusters*) involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios crípticos y gliotoxina. La virulencia de *A. fumigatus* en modelo murino no está alterada por la deficiencia del gen, por lo cual se presume que H3K4me₂ y H3K4me₃ no se requieren para la patogenicidad (Bok *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2013). La interrupción del gen *SET1* en *C. albicans* resulta en la pérdida completa de la marca H3K4, así como en hiperfilamentación cuando la cepa mutante crece embebida en medio sólido. Adicionalmente, la pérdida de *SET1* disminuye la adherencia del hongo a las líneas celulares epiteliales y atenúa su virulencia en el ratón (Raman *et al.*, 2006).

La proteína Hmt1p de *S. cerevisiae* es una metiltransferasa de arginina que no es esencial para la viabilidad celular. Hmt1p actúa en el transporte nuclear de proteínas de unión al RNA y participa de la biogénesis de mRNA. Su pérdida genera el incremento en la recombinación mitótica dentro del rDNA, así como la transcripción de regiones silenciadas de la cromatina y la disminución de la marca H4R3me₂. Hmt1 está

involucrado en el establecimiento y el mantenimiento de la cromatina silenciada en el organismo (Yu *et al.*, 2006). Se ha reportado que el reclutamiento de Rpd3 (desacetilasa de histonas) a los telómeros es dependiente de Hmt1p (Milliman *et al.*, 2012). Algunas mutaciones en *HMP1* generan alelos que inducen la sensibilidad del hongo a las bajas temperaturas (McBride *et al.*, 2000). En *C. albicans*, *HMT1* tampoco es fundamental para el crecimiento y desarrollo del patógeno (McBride *et al.*, 2007).

Los homólogos de la metiltransferasa de arginina RmtC en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, no son esenciales para su viabilidad, no obstante, la interrupción de *HSL7* en *S. cerevisiae* causa morfología celular anormal, células madres alargadas, alteraciones de la división celular y del particionamiento nuclear. La tolerancia al Ca^{++} se encuentra disminuida y la sensibilidad al calcofluor blanco, incrementada (Bauer *et al.*, 2010; Kucharczyk *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1996). Por su parte, la mutación de *skb1* en *S. pombe* genera células menos elongadas, con crecimiento ligeramente más lento respecto a las células silvestres. *Skb1* actúa como un regulador negativo de la mitosis (Gilbreth *et al.*, 1998; Gilbreth *et al.*, 1996).

En *S. pombe* se caracterizó el gen correspondiente a la proteína desmetilasa de histonas *Jmj2*, la cual puede desmetilar los tres estados de metilación posibles sobre la posición H3K4. La mutación de *jmj2* no tiene efectos sobre el estado de metilación global de H3K4, lo que indica que existen otras desmetilasas que pueden llevar a cabo esta función (Huarte *et al.*, 2007). De igual forma, se determinó que la proteína *Jhd2* es responsable por la desmetilación de H3K4 en *S. cerevisiae* (Tu *et al.*, 2007). *ClrD* de *A. fumigatus* (codifica para una metiltransferasa de H3K9, ortóloga de DIM-5) es necesaria para el crecimiento normal del hongo y para la formación del conidióforo. La remoción de *clrD* ocasiona la reducción del crecimiento radial, de la formación de conidias y de la pigmentación de la colonia. *ClrD* no participa de la defensa contra los macrófagos alveolares en ensayos con líneas celulares (Palmer *et al.*, 2008).

En algunas especies de *Aspergillus* se ha determinado que los grupos de genes transcripcionalmente inactivos para la síntesis de esterigmatocistina y monodictefinona, están asociados con cromatina rica en marcas H3K9me. Al entrar los cultivos en la fase estacionaria, dichas marcas son removidas, permitiéndose la expresión de los genes para

síntesis de metabolitos secundarios. En *A. nidulans*, la interrupción de los genes *hepA* (codifica para el ortólogo de *HP1*) y *clrD* no genera fenotipos morfológicos evidentes respecto a las cepas silvestres. Sin embargo, la pérdida de HepA y de ClrD ocasiona la sobreexpresión de algunos de los genes del grupo involucrado en la producción de esterigmatocistina. La mutante de *hepA* también evidencia la sobreexpresión del gen *LaeA*, que codifica para el regulador general de la síntesis de metabolitos secundarios en los hongos. LaeA es la proteína encargada de mediar la remoción de las marcas heterocromáticas cuando se activa el metabolismo secundario. La mutación de *hepA* ocasiona además la disminución de los niveles de H3K9me (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). En *A. nidulans*, la interrupción de los genes de metiltransferasas de arginina *rmtA* y *rmtC*, ocasiona el incremento de la sensibilidad del hongo a la presencia de peróxido de hidrógeno. No obstante, estas mutaciones no provocan alteraciones importantes de la viabilidad celular o del crecimiento (Bauer *et al.*, 2010).

El gen *rmt1* del basidiomiceto *Coprinopsis cinérea*, el cual codifica para un ortólogo de *HMT1*, es necesario para el crecimiento y desarrollo normal del hongo. La cepa mutante correspondiente presenta un defecto que le impide iniciar la formación de cuerpos fructificantes (Nakazawa *et al.*, 2010). El gen ortólogo en *F. graminearum* es necesario para el crecimiento vegetativo del hongo, pero no para su reproducción sexual. Su interrupción ocasiona la disminución de la virulencia en plantas de maíz y trigo, debido a que la mutación incapacita al hongo para extenderse e invadir los tejidos de los hospederos. La producción de DON esta reducida. La tasa de crecimiento de la cepa mutante esta disminuida en presencia de agentes que inducen estrés oxidativo o de membrana, pero no bajo condiciones de estrés osmótico. La remoción de *AMT1* permite la expresión de genes que se encuentran adyacentes a los telómeros. Las cepas mutantes para los genes de metiltransferasas de arginina *AMT2*, *AMT3* y *AMT4* no evidencian cambios fenotípicos aparentes respecto al fenotipo silvestre (Wang *et al.*, 2012).

La proteína HEP1, ortóloga de HP1 en el fitopatógeno *F. graminearum*, regula negativamente los genes para la síntesis de aurofusarina (pigmento rojo). En ausencia del gen respectivo se incrementa la producción del pigmento, sin embargo, el crecimiento y el desarrollo del hongo no se encuentran afectados. Existe una disminución drástica de la

marca H3K9me, por lo que es probable que HEP1 interactúe con la metiltransferasa de histonas H3K9 durante el proceso de metilación (Reyes-Dominguez *et al.*, 2012). Por su parte, la remoción del gen *kmt6* en este mismo organismo (codifica para una metiltransferasa de histonas que modifica H3K27), produce alteraciones morfológicas, del crecimiento y esterilidad; así como la expresión constitutiva de genes que codifican para micotoxinas, pigmentos y otros metabolitos secundarios. Ante la ausencia del gen *kmt6*, el genoma se expresa un 14% más; *kmt6* es un represor del metabolismo secundario. En los ensayos del "tomate herido", la cepa mutante es incapaz de colonizar el fruto, lo cual sugiere que tiene patogenicidad disminuida (Connolly *et al.*, 2013).

La ausencia de los genes *amt-1*, *amt-3* y *skb-1* en *N. crassa* (ortólogos de *PRMT1*, *PRMT3* y *PRMT5*, respectivamente) ocasiona la reducción del crecimiento del hongo debido a la disminución de la tasa de elongación de las hifas. Adicionalmente, la interrupción de *amt-3* altera la distancia de ramificación de estas últimas. La mutación de *skb-1* resulta en un incremento significativo de la producción de macroconidias y de la resistencia al inhibidor de quitina sintasas Polioxina D. Lo anterior puede indicar que SKB1 participa de la regulación de la maquinaria de biosíntesis de la pared celular. La cepa mutante para *amt-1* exhibe sensibilidad incrementada frente al inhibidor de la síntesis de ergosterol, voriconazol; por lo que AMT1 puede estar involucrada en procesos relacionados con la integridad de la membrana celular (Feldman *et al.*, 2013). En este mismo organismo, la remoción de Set1 genera un fenotipo de reloj arrítmico debido a defectos en la expresión del gen *frq* (*frecuencia*). Este gen codifica para una proteína que actúa como un elemento que bloquea la expresión de elementos que favorecen la transcripción de genes de reloj y asociados. La expresión de *frq* esta alterada tanto en la regulación de la expresión génica circadiana como en aquella llevada a cabo por luz. H3K4me3 podría estar involucrado en la regulación negativa de *frq*. Set1 se requiere para la metilación del DNA en el promotor de *frq*. Los relojes circadianos eucarióticos requieren modificaciones de la cromatina (Raduwan *et al.*, 2013).

En el fitopatógeno ascomiceto *Leptosphaeria maculans*, el silenciamiento de los genes *HP1* y *Dim-5*, por iRNA, causa la disminución del crecimiento del hongo; no obstante, únicamente el silenciamiento del gen *Dim-5* ocasiona, además, la reducción de la

patogenicidad. Las transformantes obtenidas para *HP1* mantienen el 30% de la expresión del gen, representando solo 1/3 de las transformantes primarias totales, por lo cual se presume que la ausencia completa de *HP1* es letal en el hongo. Es posible que la virulencia de estas cepas no este afectada debido a que el silenciamiento de *HP1* no es drástico. La transformante para *Dim-5* exhibe descondensación parcial de la cromatina durante el crecimiento micelial. *HP1* y *Dim-5* generan la formación de heterocromatina en loci de avirulencia del hongo, y la expresión de los genes efectores esta mediada por la ausencia de la marca H3K9me3 en estas regiones. Los genes que codifican para efectores normalmente se encuentran silenciados durante el crecimiento micelial (Soyer *et al.*, 2014).

Los genes *kmt1*, *set1*, *kmt3*, *kmt6* y *kmt2h*; los cuales codifican para metiltransferasas de histonas en *M. oryzae*, participan en la morfogénesis o virulencia del hongo en diferentes grados. KMT1 es un parólogo de DIM-5, su ausencia genera una ligera reducción en su crecimiento y patogenicidad. KMT6 pertenece a la familia de metiltransferasas de histonas H3K27, la mutación del gen correspondiente produce defectos en el desarrollo y patogenicidad disminuida. La interrupción de *kmt3*, gen que codifica para el ortólogo de Set2 encargado de la metilación de H3K36; y de *kmt2h*, gen cercano a *ASHIL* de humanos, encargado de la metilación de H3K4 y H3K36; causa la reducción significativa del crecimiento vegetativo, germinación, producción de apresorio, conidiación y patogenicidad. La pérdida de Set1, metiltransferasas H3K4, es la que ocasiona los mayores defectos en el crecimiento vegetativo, la formación de apresorio, conidiación y virulencia en el hongo. Aproximadamente la mitad de los genes que se activan o se reprimen durante la morfogénesis asociada con la infección, son dependientes de Set1 (Pham *et al.*, 2015). Set1 regula la activación dependiente de sustrato de las enzimas que degradan la pared celular en el hongo (Pham *et al.*, 2014). La interrupción de *SET1* en *F. graminearum* causa crecimiento disminuido de las hifas en agar PDA, así como la disminución de la virulencia en la planta de trigo, con lesiones que se restringen únicamente al sitio de inoculación. Los genes involucrados en la síntesis de DON y aurofusarina poseen bajos niveles de H3K4me, por lo que su grado de transcripción es bajo. La cepa mutante no produce DON, ni aurofusarina, y evidencia resistencia a agentes que dañan la pared celular como el Rojo Congo y el calcofluor blanco (Liu *et al.*, 2015b).

En *A. flavus*, la metiltransferasa de arginina RmtA (H4R3) se requiere para la conidiación normal del hongo, debido a que regula negativamente varios genes necesarios para la activación de éste proceso. La remoción de *rmtA* incrementa la producción de conidias, pero suprime por completo la síntesis de esclerocios. De igual forma, disminuye la producción de aflatoxina B e incrementa la tolerancia del hongo al estrés oxidativo (Satterlee *et al.*, 2016).

Dot1 de *A. flavus* está involucrada en el crecimiento vegetativo, esporulación y formación de esclerocios. La cepa con el gen *DOT1* interrumpido, evidencia un diámetro colonial disminuido, baja producción de conidióforos y sobreexpresión de los genes involucrados en la síntesis de esclerocios, por lo que se concluye que Dot1 normalmente regula negativamente la producción de estos últimos en el hongo. La sensibilidad de la cepa mutante frente a agentes de estrés genotóxico y de la pared celular fue menor que la registrada para las cepas silvestre y complementada. La ausencia de *DOT1* afecta severamente la síntesis de aflatoxinas, así como la capacidad del hongo para colonizar las semillas del maíz (Liang *et al.*, 2017).

La interrupción del gen que codifica para la desmetilasa de histonas *JMJI* en *M. oryzae* disminuye el crecimiento radial en medio sólido y la producción de conidias. El número de conidióforos se reduce. Las conidias presentan un patrón de germinación bipolar y retardo significativo en la formación de apresorio, defecto que no se corrige con la adición de cAMP. Las habilidades para penetrar, invadir y colonizar el hospedero, están notablemente afectadas. La mutante pierde la capacidad de formar apresorio a partir de las hifas (Huh *et al.*, 2017). En *F. fujikuroi*, la interrupción de *SET2* y *ASH1* afecta el crecimiento vegetativo, conidiación, metabolismo secundario y atenúa la patogenicidad del hongo en la planta de arroz (Janevska *et al.*, 2018a). En este mismo organismo, la mutación de *SET1* y la sobre-expresión del gen para la desmetilasa de histonas *KDM5*, ocasionan el retraso del crecimiento de las hifas y alteraciones del metabolismo secundario. La ausencia de Set1 provoca una fuerte reducción de la virulencia del hongo en la planta de arroz. Set1 y Kdm5 actúan como activador y represor de la conidiación, respectivamente (Janevska *et al.*, 2018b).

2.2 *Ustilago maydis* (DC.) Corda

2.2.1 Historia

Ustilago maydis es un hongo fitopatógeno, basidiomiceto, dimórfico, conocido por ser el agente etiológico de la enfermedad del carbón común del maíz o “huitlacoche”, la cual se caracteriza por la aparición de tumores en el elote y en las partes verdes de la planta que, al madurar, producen abundantes masas negras, polvorientas, similares al hollín, propias de los hongos denominados “*smut*” o del carbón. Estos hongos requieren del sexo para causar enfermedad y son los responsables de millones de dólares en pérdidas de cultivos a nivel mundial (Bakkeren *et al.*, 2008; Klosterman *et al.*, 2007; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Pham *et al.*, 2009; Vollmeister *et al.*, 2012). *U. maydis* es uno de los organismos modelo más y mejor estudiados en la actualidad, sus primeros reportes datan de hace más de 250 años luego de su introducción a Europa. En los inicios de la investigación de la enfermedad producida por *U. maydis* no se consideraba que ésta fuera causada por un patógeno, debido a las dificultades que se presentaban para conseguir la infección deliberada del maíz (*Zea mays* ssp. *mays*). Lo anterior llevó a los primeros investigadores a pensar que la causa de la enfermedad era de naturaleza abiótica. Brefeld (1883-1895) proporcionó evidencia de que la patología era de origen fúngico, al rociar la planta del maíz con una suspensión de esporas, colocar gotas de esta suspensión en el verticilo espiral de la planta y conseguir su infección. Brefeld había demostrado además que el hongo podía ser mantenido en sustratos nutritivos. *U. maydis* se denominó *Lycoperdon zae* por Beckmann (1768) y *Necrosis* por Paulet (1793), posteriormente se conoció como *Ustilago* por Persoon (1801), quien tomó éste nombre de Bauhin (1651), también se citó como *Uredo* y *Caeoma*, *Ustilago zae* por Unger (1836), y finalmente como *Ustilago maydis* (DC.) Cda., por Stevenson y Johnson (1944), nombre que mantiene hasta la actualidad (Christensen, 1963; Clinton, 1906; Persoon, 1801).

Se presume que *U. maydis* surgió en México, en tanto este país es el centro de origen de sus hospederos ancestrales los teocintles (*Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana*). Adicionalmente, la historia filogeografía y estructura genética de las poblaciones del simbionte Umv-H1, el cual se transmite durante el apareamiento del

hongo, indican que en México se encuentra la población ancestral de este virus (Voth *et al.*, 2006). La palabra *Ustilago* proviene del latín *ustilare*, que significa “quemar”, en referencia a la apariencia del tumor maduro producido por el hongo en el elote. A su vez la palabra “huitlacoche” deriva de la palabra Nahuatl “*cuítlacuchin*” o “*cuítlacuchtli*” que significa “mazorca de maíz degenerada y diferente de las otras”. La palabra *Huitlatl* es “excremento” y la palabra *coche*, “negro” (Juarez-Montiel *et al.*, 2011).

Para la mayoría de agricultores en el mundo, el huitlacoche es una plaga que afecta la producción del maíz. Se calcula que aproximadamente el 2-5% de las plantas en un campo pueden llegar a ser infectadas por el patógeno, aunque bajo las condiciones apropiadas, se puede alcanzar entre un 50 a 80% de infección (Begerow *et al.*, 2014; Christensen, 1963; Steinberg y Perez-Martin, 2008). No obstante, el huitlacoche en México es un alimento que se ha preparado y consumido desde la época prehispánica, cuando Mesoamérica era poblada por diversas culturas indígenas. Desde entonces, el hongo se consume como parte de quesadillas, crepas, sopas, tacos y tamales, y es reconocido por su alto contenido nutricional. Se calcula que en la Ciudad de México se venden 400-500 toneladas de huitlacoche durante los meses de Julio y Agosto (Aydoğdu y Gölükçü, 2017). En épocas recientes, el interés y el gusto por el huitlacoche ha dejado de ser exclusivo de México, el consumo del hongo se ha extendido a otros países de América, Asia y Europa, donde es un ingrediente sofisticado y costoso de la “alta cocina”, y se le conoce como la “trufa mexicana”, el “caviar azteca” o el champiñón del maíz (Bauer *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2012).

El origen de *Ustilagomycotina*, subdivisión de los Basidiomicetos a la que pertenece *U. maydis*, se remonta a hace 300 millones de años, por lo que sus linajes ancestrales son anteriores a la radiación de los angiospermas (Begerow *et al.*, 2014; Taylor y Berbee, 2006). Los pastos, familia de angiospermas a la cual pertenecen los teocintles y el maíz, se originaron hace aproximadamente 55-70 millones de años, tiempo después de la extinción de los dinosaurios (Kellogg, 2001). La separación entre *Zea* y *Sorghum* sucedió hace 11-24 millones de años y entre *Sorghum* y *Saccharum* hace 5 millones de años. La divergencia entre *U. maydis* y otros hongos del carbón, *Sporisorium reilianum*, *Sporisorium sorghi* y *Ustilago scitaminea*, patógenos del sorgo y de la caña de azúcar

respectivamente, ocurrió hace 31-54 millones de años. La divergencia con *U. hordei* se produjo hace 21-27 millones de años. De igual forma, la divergencia entre *U. maydis* y *U. bouriquetii* se produjo hace 17.7 ± 7.4 millones de años (Laurie *et al.*, 2012; Munkacsi *et al.*, 2007, 2008). Se calcula que la domesticación del maíz a partir de *Zea m. ssp. parviglumis* ocurrió hace aproximadamente 6000-10000 años en el Valle del Río Balsas. El maíz fue introducido a América del Sur hace 4000-7000 años y a USA hace 1000-3000 años, por nativos, que a su vez, transportaron y diseminaron el patógeno (Munkacsi *et al.*, 2008). Aunque es evidente que *U. maydis* ha interactuado con plantas de poblaciones naturales ancestrales de la familia de los pastos por millones de años, la domesticación del maíz tuvo un impacto en las poblaciones del hongo que existen en la actualidad. Contrario a lo que podría esperarse, las poblaciones de *U. maydis* en México no tienen una mayor variación genética que las poblaciones descendientes de USA y América del Sur. De igual forma, se han reportado un mayor número de variantes alélicas del locus *b* en USA y América del Sur, respecto a México. Se cree que la actividad humana y las prácticas agrícolas son las principales causas de estos hallazgos (Munkacsi *et al.*, 2007, 2008).

Cuatro sucesos importantes han marcado la historia del estudio de *U. maydis*. 1) Los trabajos de Robin Holliday sobre la genética del hongo (Holliday, 1961a). 2) La caracterización genética y molecular de los loci de apareamiento, así como de los detalles de la compatibilidad sexual y su rol en la patogenicidad (Banuett y Herskowitz, 1989; Day *et al.*, 1971; Holliday, 1961b; Puhalla, 1968, 1970; Rowell, 1955; Rowell y DeVay, 1954; Schulz *et al.*, 1990). 3) La secuenciación del genoma completo, trabajo que fue publicado en 2006 y al que se puede acceder a través de la página de MUMDB (MIPS Ustilago maydis Genome Database) <https://www.helmholtz-muenchen.de/ibis/institute/groups/fungal-microbialgenomics/resources/mumdb/index.html> (Kamper *et al.*, 2006). La secuenciación del genoma ha permitido un conocimiento más detallado del patógeno, así como de otros hongos del carbón, y ha facilitado su investigación a nivel molecular. 4) El desarrollo de cepas haploides solopatogénicas, las cuales no requieren de compañero sexual para causar enfermedad (Kamper *et al.*, 2006; Vollmeister *et al.*, 2012).

En la actualidad, *U. maydis* se ha convertido no solo un excelente modelo para el estudio de la patogenicidad fúngica en las plantas, sino también para el estudio de otros procesos tales como señalización celular, regulación transcripcional y post-transcripcional, transporte molecular, regulación del ciclo celular, apareamiento, recombinación y reparación del DNA (Vollmeister *et al.*, 2012).

2.2.2 Clasificación

De acuerdo con la información de ITIS (Integrated Taxonomic Information System), la jerarquía taxonómica de *U. maydis* es la siguiente: Reino: Fungi, Subreino: Dikarya, División: Basidiomycota, Subdivisión: *Ustilaginomycotina*, Clase: *Ustilaginomycetes*, Subclase: *Ustilagenomycetidae*, Orden: *Ustilaginales*, Familia: *Ustilagenaceae*, Género: *Ustilago*, Especie: *Ustilago maydis* (DC.) Corda. *Ustilaginomycotina* incluye principalmente hongos parásitos de plantas que se encuentran restringidos a la distribución geográfica de sus hospederos. Estos hongos se caracterizan por ser dimórficos y por presentar una fase de crecimiento levaduriforme en algún punto de su ciclo de vida (Wang *et al.*, 2015). Los miembros de *Ustilaginomycotina* tienen una composición de pared celular distintiva con prevalencia de la glucosa y ausencia de la xilosa, aspecto que los separa de las subdivisiones *Pucciniomycotina* y *Agaricomycotina*, sin embargo, comparten la estructura secundaria tipo B del RNA ribosomal (rRNA) 5S con *Agaricomycotina* y la carencia de parentosomas con *Pucciniomycotina*. Como novedad evolutiva y característica distintiva de sus interacciones celulares con los hospederos, *Ustilaginomycotina* presenta vesículas primarias de interacción y poros con tapas membranosas sencillas (Bauer *et al.*, 1997; Begerow *et al.*, 2014).

Ustilaginomycetes incluye a todos los Basidiomycota parásitos de plantas holobasidiados, que no poseen a nivel de los poros elementos modificados del retículo endoplásmico en capas múltiples, así como a todos los Basidiomycota parásitos de plantas de septo simple, fragmobasidiados, teliospóricos que producen órganos intracelulares sin cuellos de penetración. En total, más de 1400 especies de aproximadamente 78 géneros. Los *Ustilaginomycetes* son teliospóricos, gastroídes y dimórficos. Las especies aisladas para las que únicamente ha sido reportada una fase anamórfica, se ubican en el género

Pseudozyma (Begerow *et al.*, 2014). Los estudios filogenéticos moleculares indican que, *Pseudozyma prolífica* es conespecífica con *U. maydis*, por lo que pertenecen a la misma especie (Begerow *et al.*, 2014; McTaggart *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015).

Con excepción de *Melanotaeniurn oreophilum* y *Melanotaeniurn selaginellae*, que parasitan espigas, de *Exoteliospora osmundae* que parasita helechos, y de dos especies de *Uleiella* que parasitan coníferas, los *Ustilaginomycetes* poseen un rango de hospederos restringido a los angiospermas. A su vez, la mayoría de *Ustilaginomycetes* son parásitos de monocotiledones, especialmente de los miembros de las familias *Poaceae* y *Cyperaceae*, aunque en varios puntos de la evolución algunos miembros dieron saltos a los hospederos dicotiledones. Los ancestros de los *Ustilaginomycetes* posiblemente han evolucionado paralelamente a sus hospederos por miles de años y el paso que eventualmente han dado a nuevos hospederos, es lo que ha permitido el surgimiento de nuevos taxa (Bauer *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 1997). La especificidad de hospederos que se observa en la actualidad puede ser el resultado de eventos de extinción masiva durante la evolución (Begerow *et al.*, 2014; Taylor y Berbee, 2006).

Los *Ustilaginales* son hongos que se caracterizan por formar grandes zonas de interacción con sus hospederos, haber perdido los poros septales y producir hifas intracelulares. En su mayoría esporulan en las partes reproductivas de los hospederos y la telioesporogénesis ocurre por desarticulación, eventos que son precedidos por la gelatinización de las paredes de las hifas. Las teliosporas son usualmente oscuras y germinan formando un fragmobasidio de cuatro células (Begerow *et al.*, 2014). Además de *Ustilago*, otros géneros representativos de los *Ustilaginales* son *Sporisorium* y *Macalpinomyces* (Bauer *et al.*, 2001). Estos tres géneros contienen más de 600 especies que en la actualidad representan un reto taxonómico, debido a que han eludido la resolución morfológica y molecular. Es por lo anterior que no existe una delimitación clara entre los géneros en cuestión, los tres son polifiléticos (McTaggart *et al.*, 2012b). *Sporisorium* y *Ustilago* juntos forman un grupo monofilético, pero la posición de *Macalpinomyces* es ambigua (McTaggart *et al.*, 2012a). *Macalpinomyces* se creó para acomodar hongos del carbón con características intermedias entre *Ustilago* y *Sporisorium*, no obstante, algunas especies de *Macalpinomyces* corresponden realmente a *Ustilago* o a *Sporisorium* (Stoll *et al.*, 2005).

Como patógenos importantes en *Ustilaginales*, encontramos a *U. hordei*, el patógeno del carbón cubierto de la cebada; *U. nuda*, el patógeno del carbón suelto de la cebada; *U. nigra*, el patógeno del carbón negro suelto de la cebada y de la avena; *U. tritici*, el patógeno del carbón suelto del trigo; *Urocystis agropyri*, el patógeno del carbón de bandera del trigo; *Tilletia indica*, el patógeno del tizón parcial en el trigo y el triticale; *T. caries*, el patógeno del tizón común del trigo; *T. controversa*, el patógeno del tizón enano del trigo; *U. scitaminea*, el patógeno del carbón de la caña de azúcar; *S. reilianum*, el patógeno del carbón del sorgo y *Angiosorus solani*, el patógeno del carbón de la papa, entre otros. Los hongos que producen "tizón", son patógenos del carbón que esporulan en los ovarios de las plantas y causan síntomas restringidos en las semillas (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002).

La familia *Ustilaginaceae* contiene miembros que infectan únicamente a *Poaceae*, la cual incluye especies para el cultivo como el maíz, el sorgo, la caña de azúcar, la cebada y la avena (Brefort *et al.*, 2009). El género *Ustilago* incluye cerca de 170 especies que se distribuyen a lo largo de tres clados principales (polifilético). Se ha determinado a través de estudios de comparación de genomas que *U. maydis* está más relacionado con taxas diferentes, que con otras especies de *Ustilago*. Este hallazgo está soportado por otros estudios que tienen en cuenta los genes del sistema del tipo de apareamiento, del silenciamiento por RNA, así como sinapomorfias (Kellner *et al.*, 2011; Laurie *et al.*, 2012; McTaggart *et al.*, 2016; McTaggart *et al.*, 2012a). Teniendo en cuenta que *U. maydis* comparte un clado con *Macalpinomyces mackinlayi*, *M. tubiformis*, *Tubisorus pachycarpus* y *U. bouriquetiilo*, y que a su vez entre estos organismos se comparten apomorfias (sori hipertrofiado en las inflorescencias de los hospederos), McTaggart *et al.* (2016), propusieron agruparlos dentro del género *Mycosarcoma*, por lo que *Ustilago maydis* pasaría a denominarse *Mycosarcoma maydis* (McTaggart *et al.*, 2016).

2.2.3 Ciclo de vida

U. maydis es un hongo que sufre transiciones morfológicas remarcables a lo largo de su ciclo de vida, el cual transcurre entre una forma levaduriforme, saprófita, haploide y una

forma filamentosa, dicarionte, infectiva. *U. maydis* es dimórfico y heterotálico (no es autofértil o sexualmente auto-compatible, requiere de dos individuos haploides distintos con tipos sexuales diferentes y compatibles para el apareamiento) con sistema de apareamiento tetrapolar (dos loci *MAT* y al menos dos alelos en cada locus). Posee un locus *a* que gobierna el apareamiento de dos compañeros haploides compatibles, y un locus *b* que controla el desarrollo sexual, la filamentación y la patogenicidad posterior a la fusión celular. El hongo es completamente dependiente de su hospedero para completar su ciclo de vida y no puede esporular por fuera de la planta (Klosterman *et al.*, 2007).

Bajo las condiciones apropiadas de temperatura y humedad, las esporas diploides liberadas de los tumores maduros germinan y atraviesan por el proceso de meiosis. Lo anterior, da lugar a la formación de un promicelio, a través del cual migran cuatro núcleos haploides. El promicelio se septa, de forma que cada compartimento únicamente alberga un núcleo haploide. Luego de la mitosis, las células geman a partir de promicelio y empiezan su ciclo de vida vegetativo como levaduras haploides (Lanver *et al.*, 2017). Las levaduras pueden proliferar en el ambiente a partir de materia orgánica muerta presente en el suelo, y también pueden cultivarse en medios de cultivo artificiales en el laboratorio, sin embargo, en esta forma son incapaces de producir enfermedad (Brefort *et al.*, 2009; Steinberg y Perez-Martin, 2008). Se conocen pocos detalles de la distribución y las adaptaciones de las levaduras de vida libre en sus hábitats naturales, no obstante, se ha reportado su habilidad para degradar compuestos relacionados con las plantas tales como sacarosa, celobiosa, trealosa, arabinosa y xilosa, también polioles, moléculas aromáticas e intermediarios de la lignina. Debido a lo anterior, estas levaduras eventualmente podrían ser aisladas de plantas, hábitats o sustratos que no están relacionados directamente con sus hospederos (Begerow *et al.*, 2014).

La germinación de la teliospora da lugar a 4 tipos de células haploides diferentes, de las cuales solo dos combinaciones son competentes para el apareamiento (Wollenberg y Schirawski, 2014). Cuando sobre la superficie de la planta joven se encuentran dos células sexualmente compatibles (loci *a* y *b* diferentes), ellas se reconocen a través del sistema de receptor de feromonas codificado por el locus *a*. Las células forman tubos de conjugación que se orientan en dirección de la célula opuesta, debido al gradiente de feromonas

sintetizado por el compañero sexual. Estas estructuras pueden llegar a medir más de 100 μm . Los tubos de conjugación se fusionan en las puntas e inicia la plasmogamia, la cual da lugar a la formación de un dicarion filamentosos que tiene el ciclo celular detenido y es la forma infectiva del hongo. El dicarion requiere del hospedero para proliferar y formar esporas sexuales, de esta forma el sexo y la patogénesis están relacionados íntimamente. El filamento dicarionte se extiende apicalmente en estrecho contacto con la planta y va insertando un septo de retracción a intervalos regulares de crecimiento. Este septo separa el compartimento viable, que contiene citoplasma y se ubica en la región más apical del filamento, de los segmentos de hifa vacíos vacuolados que van quedando atrás. Los núcleos del dicarionte se ubican a 50 μm de la punta de la hifa, y a una distancia de 10 μm entre ellos. La formación del filamento dicarionte y el desarrollo patogénico, están controlados por el locus *b* (Bakkeren *et al.*, 2008; Lanver *et al.*, 2017; Steinberg y Perez-Martin, 2008; Vollmeister *et al.*, 2012).

En respuesta a las señales físicas y químicas del hospedero, el filamento dicarionte se diferencia en un apresorio no melanizado, estructura que penetra la capa de células epidermales de la planta. Se considera que la penetración es mediada por la acción de enzimas degradadoras de la pared celular, más que por una fuerza mecánica (Begerow *et al.*, 2014; Matei y Doehlemann, 2016). Una vez en el interior, el ciclo celular del dicarionte se reactiva, y la hifa crece intracelularmente rodeada por la membrana plasmática del hospedero. Lo anterior, permite el establecimiento de zonas extensas de interacción íntima entre el hospedero y el hongo, evento que es fundamental para una infección biotrófica exitosa. Esta interacción está mediada por la secreción de vesículas de proteínas efectoras, que, entre otras funciones, interfieren con la respuesta de defensa de la planta. Se observa la formación de estructuras tipo “*clamp*”, o abrazera, las cuales se requieren para la adecuada segregación de los núcleos del dicarion (Begerow *et al.*, 2014; Lanver *et al.*, 2017).

En estados avanzados del proceso patogénico, el crecimiento del filamento dicarionte ocurre intercelularmente, lo cual coincide con la hipertrofia de los tejidos de la planta y el reinicio de la división mitótica de sus células. Estos eventos dan lugar a la formación de los tumores. Los núcleos del dicarion se fusionan, las células diploides resultantes se

dividen masivamente y se acumulan en las cavidades apoplásticas, rodeadas por una matriz de polisacáridos gelatinosa. Ocurre la fragmentación de las hifas y la formación de las teliosporas melanizadas ornamentadas, las cuales, al ser liberadas, inician nuevamente el ciclo descrito (Figura 2a y Figura 2b) (Banuett y Herskowitz, 1996; Lanver *et al.*, 2017).

Las células levaduriformes de *U. maydis* son uninucleadas, tienen un tamaño entre 15-21 μm de largo, 5 μm de ancho y una forma cilíndrica característica con extremos ligeramente cónicos (forma de cigarrillo). Su morfología es comparable con la de las células de *S. pombe*, no obstante, *U. maydis* prolifera por gemación de forma indefinida. En el proceso de división, la levadura se expande por crecimiento polar de la punta de la célula (en el ápice, ligeramente por fuera del centro) formando una gema al interior de la cual, el núcleo de la célula madre migra al alcanzar 2/3 del tamaño de la célula parental (Figura 3).

La gema crece por extensión de su punta y la mitosis abierta ocurre en la célula hija. A continuación, el núcleo más cercano a la célula parental, regresa a su localización original. Finalmente, se forman dos septos en la región del cuello, donde se originó la gema, para la separación final de ambas células. *U. maydis* puede utilizar el mismo sitio de gemación varias veces, o puede elegir uno nuevo en el mismo polo o en el opuesto (Banuett y Herskowitz, 2002; O'Donnell y McLaughlin, 1984; Vollmeister *et al.*, 2012). Luego del apareamiento de dos levaduras sexualmente compatibles, se forma el dicarion filamentosos (forma patogénica del hongo), el cual crece intra e inter celularmente como hifas cilíndricas alargadas separadas por septos (Banuett y Herskowitz, 1996). Las hifas infectivas se desarrollan por crecimiento apical. En el polo de desarrollo se encuentra un cono, que es la estructura responsable por la expansión de la membrana y la pared celular del hongo. El cono de crecimiento contiene dos subunidades macromoleculares, el Spitzenkörper (cuerpo apical) y el polarisoma (Steinberg y Schuster, 2011; Vollmeister *et al.*, 2012). El Spitzenkörper es un centro de organización y suministro de vesículas que transportan moléculas necesarias para el crecimiento de la hifa, enzimas constructoras de la pared celular y enzimas de secreción.

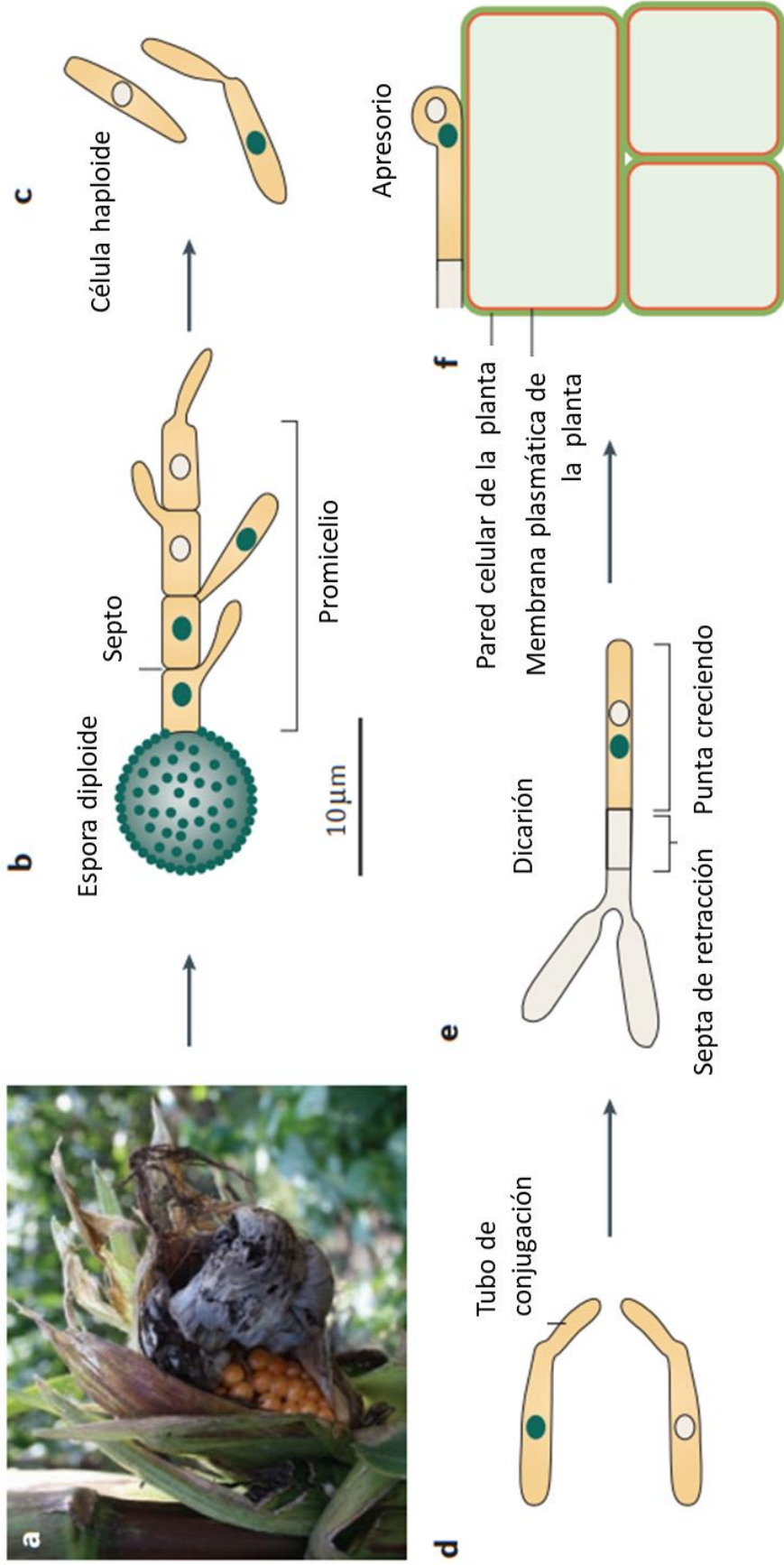
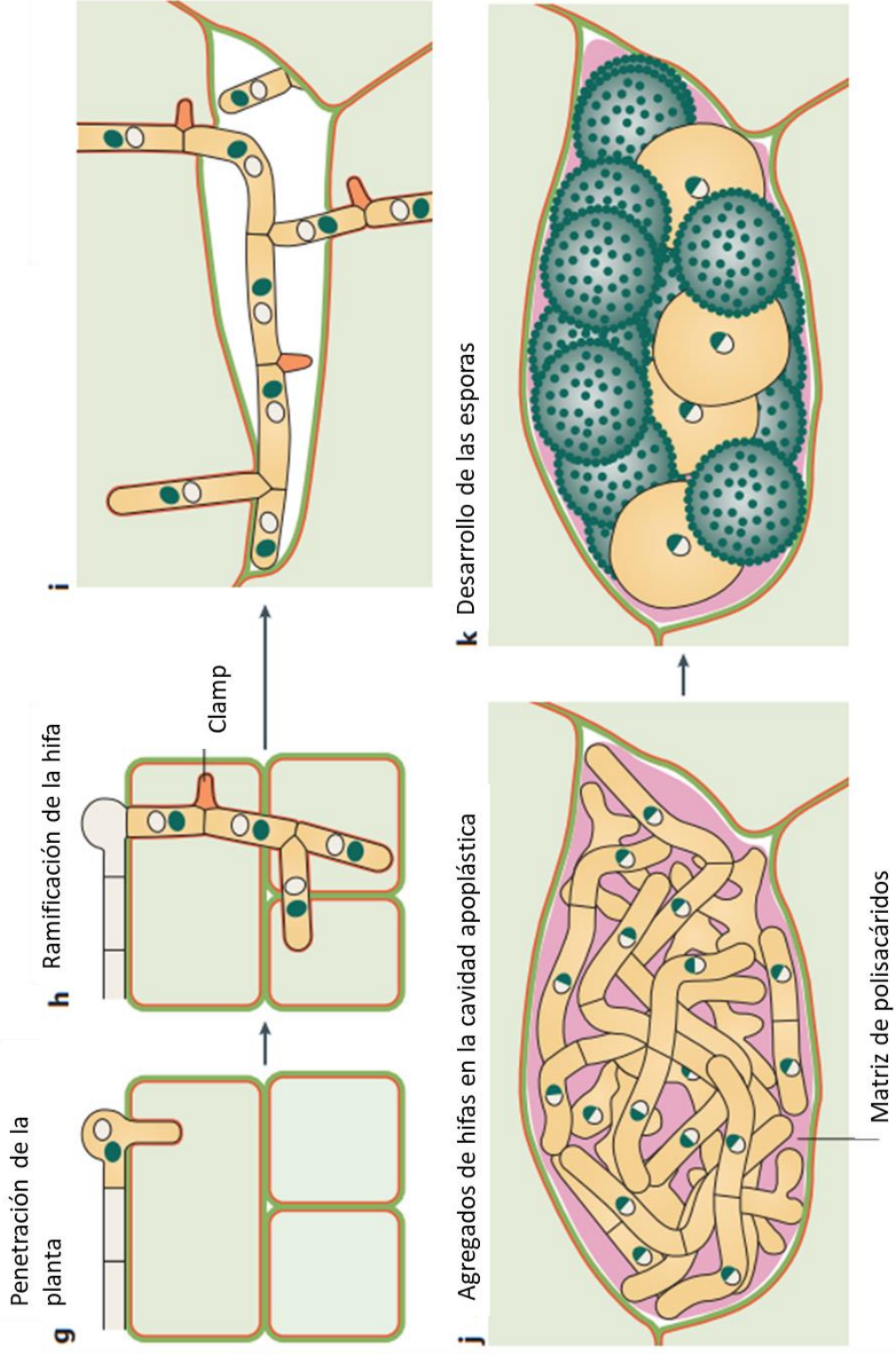


Figura 2a. Ciclo de vida de *U. maydis*. Parte 1. a) Elote con un tumor maduro producido por la infección de *U. maydis*. b) Germinación de la teliospora liberada en el ambiente. c) Células haploides formadas por división mitótica a partir de los compartimentos del promicelio. d) Detección de compañeros sexualmente compatibles y formación de tubos de conjugación. e) Formación del dicarion y detención del ciclo celular. f) Diferenciación de la punta de la hifa dicariótica en el apresorio. Modificado de: Lanver *et al.*, 2017.



de **Figura 2b.** Ciclo de vida de *U. maydis*. Parte 2. g) Penetración de las células de la planta. h) Reactivación del ciclo celular y ramificación de las hifas. i) Hifas intercelulares. j) Cariogamia y proliferación de células diploides en las cavidades apoplásticas. Formación de una matriz de polisacáridos gelatinosa. k) Fragmentación de las hifas y síntesis de las teliosporas. Modificado de: Lanver *et al.*, 2017.

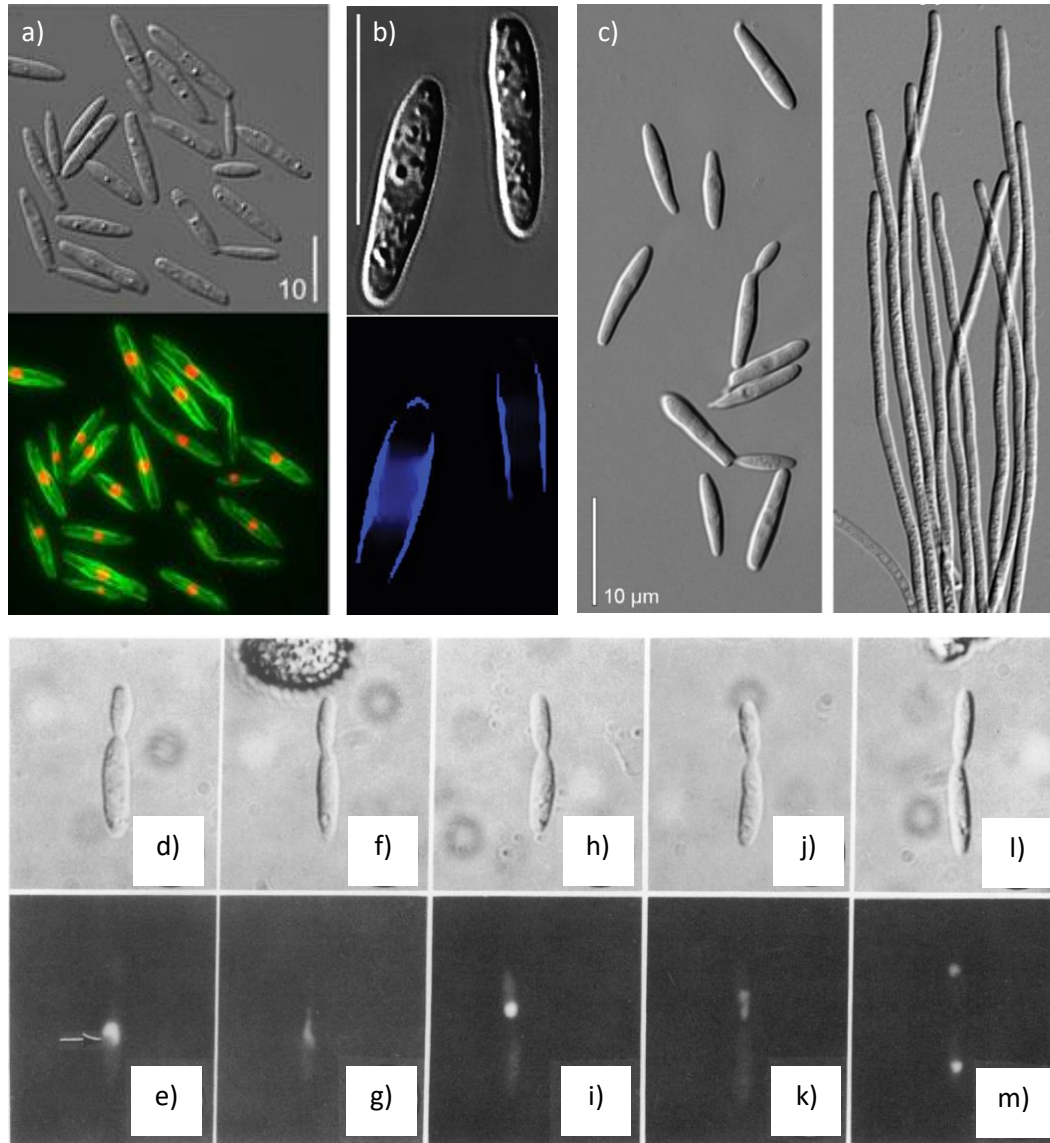


Figura 3. Estados morfológicos y división celular en *U. maydis*. a) Células haploides en medio líquido, el núcleo de cada célula (rojo) se localiza en el medio de la esporidia. Los microtúbulos se observan en verde. b) Detalle de las células de *U. maydis* teñidas con calcofluor. c) Formación de hifas luego del apareamiento de células sexualmente compatibles. d-m) Comportamiento del núcleo de *U. maydis* durante la división celular. Tamaño de barra: 10 µm. Modificado de: Steinberg y Pérez-Martin, 2008; Pham *et al.*, 2009; Steinberg y Schuster, 2011 y O'Donnell y McLaughlin, 1984.

La morfología del Spitzenkörper difiere entre los hongos, no obstante, está conformado por tres partes: un núcleo central que tiene composición variable, un grupo de vesículas que rodean dicho núcleo, y una nube exterior de vesículas con límites indefinidos. Además de vesículas se encuentran ribosomas y microfilamentos de actina. La posición del Spitzenkörper en la hifa determina la dirección del crecimiento. Por su parte, el polarisoma

es un complejo multiproteico que controla la nucleación de los microfilamentos de actina en los sitios polarizados de crecimiento (Harris *et al.*, 2005; Reynaga-Pena *et al.*, 1997; Riquelme y Sanchez-Leon, 2014; Steinberg, 2007). La extensión apical se basa en el transporte intracelular de vesículas y suministros de crecimiento a lo largo del citoesqueleto. En la región sub-apical, la hifa es particionada a través de la inserción de septos. Antes de la formación del apresorio y de la penetración de la planta, dichos septos forman secciones vacías de micelio, completamente desprovistas de citoplasma (Carbo y Perez-Martin, 2008; Weber *et al.*, 2003).

La formación de las teliosporas al interior de la planta, involucra el cambio de las hifas cilíndricas dicarióticas, a estructuras redondeadas, espiculadas y diploides. Luego de la proliferación del micelio dicarionte en los tejidos del hospedero, ocurre la cariogamia. De esta forma, los tumores que inician su formación, se encuentran llenos de células uninucleadas que proliferan por mitosis, lo cual constituye un estado mitótico diploide poco usual en el ciclo de vida de los hongos (Banuett y Herskowitz, 1996; Snetselaar y McCann, 2017). Posteriormente, ocurre la gelatinización y fragmentación de las hifas. Estas atraviesan por un proceso de redondeo, pigmentación y estructuración de la pared celular característica, la cual posee tres capas. Las teliosporas equinuladas subglobosas de coloración parda olivácea oscura, provenientes de los tumores maduros, usualmente tienen un tamaño entre $7-13 \times 7-11 \mu\text{m}$. (Banuett y Herskowitz, 1996; O'Donnell y McLaughlin, 1984; Shivas *et al.*, 2013; Shivas *et al.*, 2014). *U. maydis* produce 6 billones de teliosporas/cm³ de tejido tumoral (Christensen, 1963).

Cuando se inoculan plántulas de maíz en el laboratorio, a las 24 horas (h) es posible observar puntos cloróticos pequeños en los lugares cercanos al sitio de inyección. La clorosis es el amarillamiento de las hojas por la pérdida local de cloroplastos. En este punto, las levaduras se fijan a la superficie de la hoja y forman agregados donde ocurre el proceso de conjugación. La proliferación y ramificación de las hifas ocurre en los primeros 3 a 4 días posteriores a la infección, la clorosis se hace más extensiva y se aprecia a simple vista. El hongo genera una fuerte respuesta clorótica principalmente en los lugares donde los tumores se desarrollarán posteriormente. La formación de los tumores inicia en el quinto o sexto día y suele estar acompañada por la aparición de antocianina. En algunos

casos, la antocianina puede observarse desde el día 2 o 3 posterior a la inoculación. La antocianina es un pigmento rojo que es producido por la planta para proteger a las células del daño producido por la luz de alta intensidad y actúa como un antioxidante. La inducción de la producción de antocianina es una estrategia de *U. maydis* para disminuir la síntesis de lignina en la planta, en tanto, la antocianina y la lignina, comparten como precursor al ácido cumárico. La síntesis de antocianina puede entonces ocasionar la disminución de precursores para la formación de lignina, la cual constituye una barrera para la diseminación del patógeno. El tiempo de la aparición de los tumores puede afectarse por las condiciones de humedad, temperatura e intensidad de la luz. La deposición del mucilago ocurre en el octavo a noveno día y la fragmentación de las hifas en el noveno a doceavo día. El redondeo de las células inicia desde el día 10 y las células adaptan diversas morfologías hasta que alcanzan su forma final como teliosporas maduras (Banuett y Herskowitz, 1996; Lanver *et al.*, 2017)

2.2.5 Loci de apareamiento

U. maydis es un hongo heterotálico con loci que se segregan independientemente, determinando miles de especificidades de apareamiento. El locus *a* se encuentra localizado en el cromosoma 5 y el locus *b* en el cromosoma 1. Estas regiones son los equivalentes a los cromosomas sexuales de los animales y las plantas. El locus *a* codifica para una feromona y un receptor de feromona, y el locus *b* para subunidades de un factor de transcripción de homeodominio (Coelho *et al.*, 2010; Klosterman *et al.*, 2007; Laurie *et al.*, 2012; Morrow y Fraser, 2009).

2.2.5.1 Locus *a*

El locus *a* tiene dos alelos diferentes, *a1* y *a2*, los cuales comparten muy poca homología entre si y son considerados idiomórficos. Este locus permite la comunicación de las diferentes células haploides, debido a que contiene la información necesaria para la

síntesis de las feromonas y receptores de feromonas requeridas para tal fin. El locus *a1* codifica para el precursor de feromona *Mfa1* y el receptor para la feromona de *a2*, *Pra1*. El locus *a2* codifica para *Mfa2* y *Pra2*, respectivamente. La feromona secretada por un tipo de célula, es reconocida por el receptor correspondiente al tipo de célula sexualmente opuesto. Este reconocimiento desencadena una cascada de eventos de señalización que altera la expresión génica de los loci *a* y *b* (Klosterman *et al.*, 2007).

Las secuencias inmediatamente adyacentes a los genes de *a1* y *a2*, difieren entre sí. El locus *a1* abarca una región de 4 kb, mientras el locus *a2*, una región de 8 kb que contiene dos genes adicionales: *rga2* y *lga2*. Estos genes tienen posibles funciones en la herencia mitocondrial uniparental y están acompañados por el pseudogen *rba2*, el cual puede ser la reliquia de una antigua feromona (Bakkeren *et al.*, 2008; Bortfeld *et al.*, 2004). Los genes de las feromonas codifican para precursores pequeños de aproximadamente 40 aminoácidos (aa), que son modificados postraduccionalmente para la obtención de péptidos maduros de 9-14 aa. Las feromonas maduras se secretan como lipopéptidos pequeños, que, al ser reconocidas por los receptores respectivos, desencadenan una serie de eventos tales como, la detención del ciclo celular en la fase G2, la activación de la cascada de MAPK y la formación de tubos de conjugación, entre otros. La identidad de secuencias entre las feromonas producidas por *U. maydis* y las de otros basidiomicetos es baja. Lo anterior tiene como propósito proteger la selección adecuada de apareamiento entre las especies de hongos y evitar la intercompatibilidad (Bakkeren *et al.*, 2008; Klosterman *et al.*, 2007; Vollmeister *et al.*, 2012).

2.2.5.2 Locus *b*

El locus *b* contiene dos genes, *bE* y *bW* (*bEast* y *bWest*), los cuales codifican para dos subunidades de un factor de transcripción de homeodominio, que consiste de una proteína clase HD1 (410 aa) y una proteína clase HD2 (626 aa), respectivamente. HD1 y HD2 no comparten homología en secuencia primaria, sin embargo, poseen una organización de dominios común. La región C-terminal de las proteínas HD es altamente conservada cuando se comparan diferentes alelos, no obstante, la región N-terminal evidencia una

variación alta. La especificidad de la dimerización de las dos proteínas HD depende de esta región variable. Algunos reportes indican la existencia de entre 25 y 35 alelos *b*. Cualquier combinación de los diferentes alelos *bE* y *bW* genera una reacción de apareamiento exitosa. El locus *b* es considerado un regulador de patogenicidad central debido a que su presencia es suficiente para que las cepas haploides lleguen a ser patogénicas (Bakkeren *et al.*, 2008; Klosterman *et al.*, 2007).

Los heterodímeros formados por la interacción de los productos de *bE/bW*, se unen a sitios de unión río arriba de los genes de respuesta a *b*. Se han identificado 345 genes regulados por el heterodímero *bE/bW*, 206 inducidos y 139 reprimidos. Entre los genes regulados positivamente, se encuentran genes que codifican para proteínas involucradas en la remodelación de la pared celular, y genes que codifican para proteínas efectoras necesarias para el establecimiento de la interacción biotrófica. Entre los genes regulados negativamente, existen reguladores del ciclo celular. Debido a lo anterior, es posible afirmar que el heterodímero *bE/bW* está involucrado en la detención del ciclo celular en la fase G2, la cual ocurre luego del apareamiento, y se mantiene hasta la penetración de la planta (Klosterman *et al.*, 2007; Vollmeister *et al.*, 2012).

2.2.6 Rutas de señalización

Una vez sucede el reconocimiento de la feromona por parte del receptor compatible, la transmisión de la señal ocurre a través del módulo de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Éste módulo consta de la MAPK quinasa *Kpp4/Ubc4* (MAPKKK), la MAPK quinasa *Fuz7/Ubc5* (MAPKK) y la MAPK *Kpp2/Ubc2* (MAPK). Simultáneamente, se da la activación de la ruta de señalización de proteína quinasa A (PKA) acoplada a proteína G-cAMP, la cual se da por estímulos nutricionales y ambientales. Ambas rutas regulan la expresión del factor de transcripción central *Prf1*, el cual induce la transcripción de grupos de genes involucrados en la respuesta a feromonas, por ejemplo, *mfa1/2*, *pra1/2* y genes del locus *b* (Figura 5). Se han identificado 375 genes regulados por feromonas, los cuales tienen funciones en la maduración de las feromonas, traducción de señales, regulación transcripcional y progresión del ciclo celular (Bakkeren *et al.*, 2008; Brefort *et*

al., 2009; Vollmeister *et al.*, 2012). Adicionalmente, y de forma independiente a Prf1, el módulo MAPK está involucrado en la regulación de la detención del ciclo celular en la fase G2, evento inducido por el reconocimiento de las feromonas. Lo anterior asegura la sincronización del ciclo celular de los núcleos de ambas células compatibles, previo a la fusión citoplasmática. Otro evento independiente de Prf1 es la formación de los tubos de conjugación para el apareamiento. Después de la plasmogamia, la señalización por feromonas desaparece por la acción del heterodímero bE/bW (Vollmeister *et al.*, 2012).

Como ya se mencionó, bE/bW se activa por Prf1, lo cual conecta el desarrollo sexual y el patogénico. Uno de los blancos tempranos de bE/bW es el regulador transcripcional maestro Rbf1, proteína responsable de la gran mayoría del programa de expresión génica dependiente de bE/bW. Rbf1 amplifica la cascada de expresión génica a través de la activación de reguladores transcripcionales como Biz1 y Fox1.

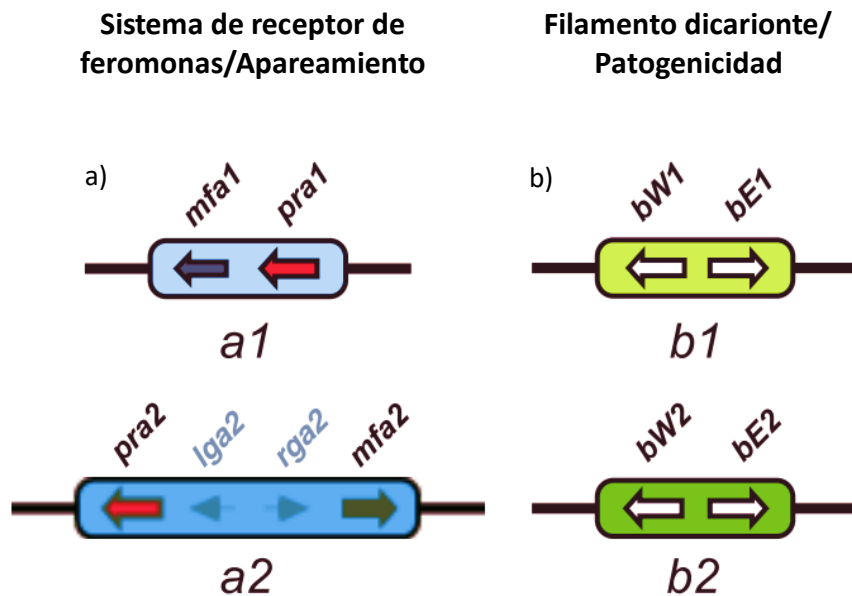


Figura 4. Representación del loci tetrapolar *MAT* de *U. maydis*. a) Locus bialélico *a*. b) Locus multialélico *b*. Modificado de: Morrow y Fraser, 2009.

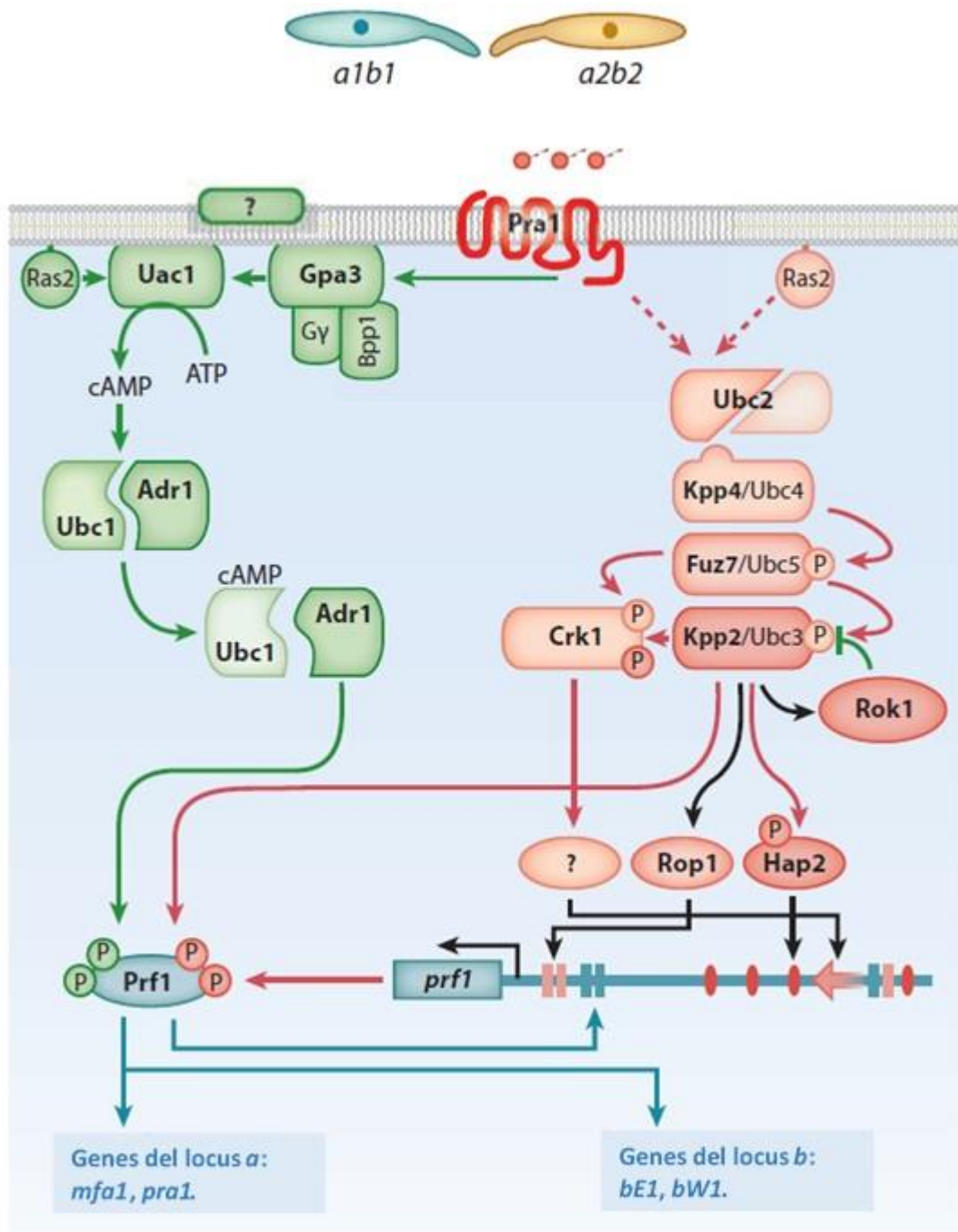


Figura 5. Red de señalización durante el apareamiento de *U. maydis*. La feromona activa su receptor específico y éste desencadena la activación de la ruta de señalización por MAPK. MAPK regula Prf1 por fosforilación, así como a nivel transcripcional, a través de las proteínas Crk1, Rop1 y Hap2. La actividad de MAPK es contrarrestada por la fosfatasa Rok1, la cual a su vez se activa a nivel transcripcional por el módulo MAPK. Existe intercomunicación entre las rutas de MAPK y PKA-cAMP. PKA-cAMP fosforila Prf1 y este puede ser un pre-requisito para la respuesta de feromonas. Prf1 conecta el desarrollo sexual con el patogénico. Verde: Componentes e interacciones de la ruta cAMP. Rojo: Componentes e interacciones de la ruta MAPK. Flechas negras: Activación transcripcional. Modificado de: Brefort *et al.*, 2009.

involucradas en la supresión de la respuesta de defensa de la planta. Otro blanco de bE/bW es *clp1*, factor involucrado en la formación de *clamp*, el mantenimiento de la detención del ciclo celular y el crecimiento filamentoso. Clp1 también interactúa con Rbf1 en la detención de la señalización por feromonas (Figura 6) (Heimel *et al.*, 2010; Vollmeister *et al.*, 2012).

Ustilago maydis no solamente tiene la capacidad de llevar a cabo el cambio dimórfico de levadura a micelio frente al estímulo del apareamiento, sino que también lo puede hacer ante determinadas condiciones ambientales, tales como la baja disponibilidad de nutrientes (nitrógeno), las condiciones de pH ácidas, la exposición al aire, lípidos y detergentes. No obstante, estas formas provenientes de células haploides no son infectivas (Klosterman *et al.*, 2007; Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Los niveles bajos de cAMP, estimulan la transición de levadura a micelio. Las cepas mutantes en el gen *uac1*, el cual codifica para la proteína adenilato ciclasa, son filamentosas constitutivas. Este efecto es revertido por la mutación de *ubc-1*, que codifica para una subunidad regulatoria de PKA, generándose levaduras multigermantes. Bajo condiciones nutrimentales normales, cAMP inactiva la subunidad Ubc-1 de la PKA, liberando las subunidades catalíticas Adr1 y Uka. Las altas concentraciones de Adr1 reprimen el desarrollo filamentoso. La mutación de *adr1* también ocasionan un fenotipo micelial constitutivo. El crecimiento levaduriforme requiere que la PKA esté activa. En conclusión, la ruta PKA-cAMP reprime el desarrollo filamentoso, mientras la ruta MAPK es un efector positivo del crecimiento micelial (Gold *et al.*, 1994; Nadal *et al.*, 2008; Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2001). La inducción de la filamentación a pH ácido también requiere de las rutas MAPK y cAMP. Cuando el pH del medio es ácido, existen niveles bajos de cAMP al interior de las células de *U. maydis*. Lo completamente opuesto ocurre en las levaduras que crecen a pH neutro. El pH ácido puede ser un inhibidor de la adenilato ciclasa. Lo anterior puede ser importante en la colonización de la planta, la cual maneja ambientes de pH ácido en sus superficies y tejidos (Martinez-Espinoza *et al.*, 2004).

Otros inductores del crecimiento filamentoso *in vitro* son los ácidos 12-hidroxiesteárico y 16-hidroxihexadecanoico. Lo anterior, se demostró en la cepa SG200AM1, la cual proviene de una cepa SG200 que fue modificada para albergar la marcación fluorescente

de una proteína relacionada con la síntesis del apresorio. Las hifas producidas no son septadas y están llenas de citoplasma, como se esperaría en los tubos de conjugación. La inducción de la filamentación también ocurre cuando SG200AM1 se desarrolla sobre superficies hidrofóbicas. Sin embargo, en presencia de este estímulo, también se consigue la formación de hifas septadas con espacios desprovistos de citoplasma y apresorios, de forma similar a lo que ocurre sobre la superficie de la planta luego del apareamiento.

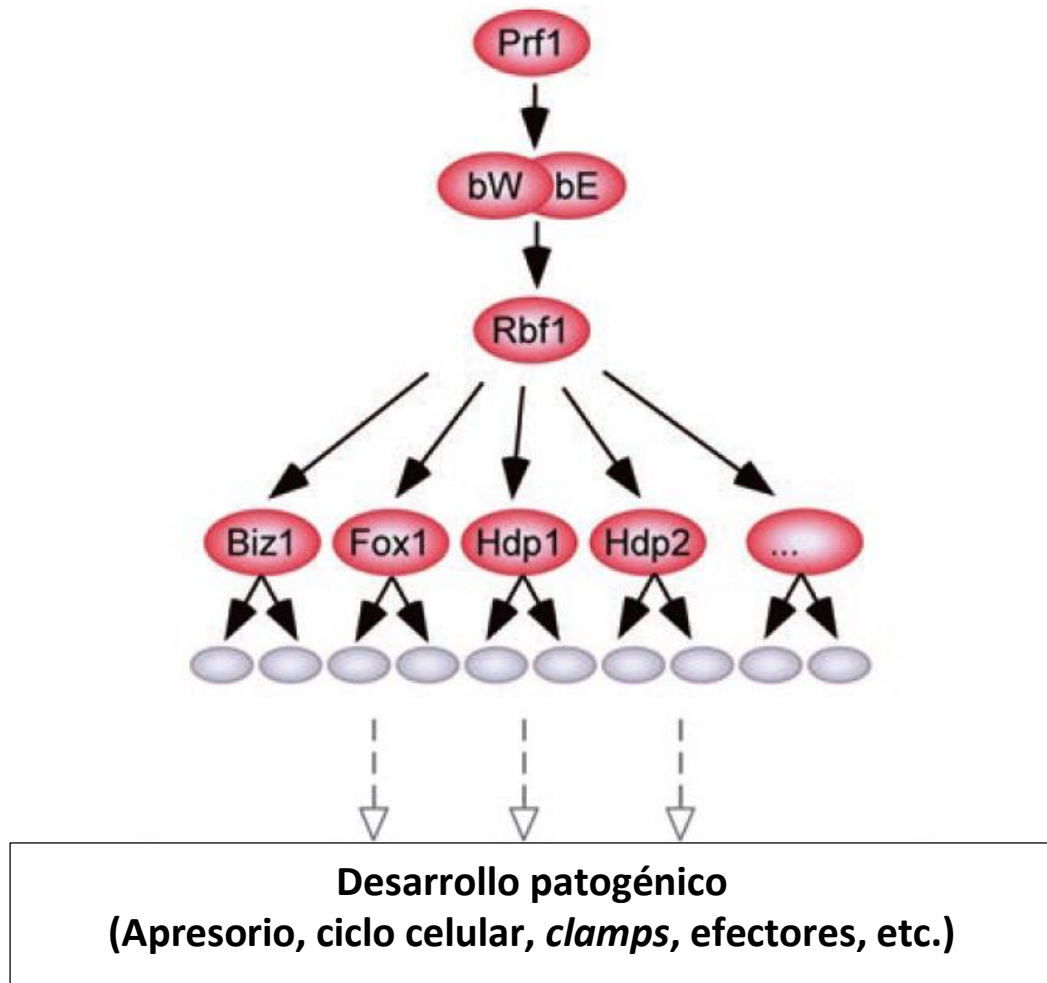


Figura 6. Representación esquemática de la cascada de factores de transcripción durante la regulación del crecimiento filamentosos y el desarrollo patológico de *U. maydis* (óvalos rojos). Se indica la existencia de varios genes que codifican para factores regulatorios, estructurales y enzimáticos (óvalos grises). Modificado de: Vollmeister *et al.*, 2012.

Lo anterior indica que, la combinación de señales químicas y físicas está involucrada en el desarrollo filamentosos y la formación del apresorio sobre la superficie de la planta. Los

monómeros de cutina tienen la capacidad de activar la expresión de genes que codifican para las feromonas y estas a su vez pueden activar las rutas cAMP y MAPK (Kamper *et al.*, 2006; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009).

2.2.8 Genoma

El genoma de *U. maydis* se encuentra distribuido en 23 cromosomas, alcanzando un tamaño aproximado de 20.5 Mb. Es un genoma considerablemente más pequeño que el de otros patógenos fúngicos, contiene una menor cantidad de genes predichos (6784 genes que codifican para proteínas), un número pequeño de intrones, no evidencia la presencia de eventos de duplicación a gran escala y está casi totalmente desprovisto de elementos de DNA repetitivos. Únicamente el 1.1% del genoma contiene secuencias derivadas de transposones, el cual es un porcentaje bajo comparado con el genoma de otros hongos (*M. grisea*, 7.3%; *C. neoformans*, 5.0%; *S. cerevisiae*, 3.1%; *N. crassa*, 4.6%). *U. maydis* no cuenta con los genes para la regulación de la expresión génica a través de iRNA (Dicer, Argonauta, RdRps), tampoco con aquellos que codifican para metiltransferasas de DNA, o proteínas asociadas con el sistema de defensa RIP (Kamper *et al.*, 2006). En el caso de los genes que codifican para la maquinaria del iRNA, estos parecen haber sido eliminados limpiamente del genoma, dejando las regiones flanqueantes en sintenia conservada, al compararse con otros genomas. Se han encontrado reliquias de la actividad de TEs en dichas regiones (Laurie *et al.*, 2012; Laurie *et al.*, 2013).

La carencia de TEs y de secuencias repetitivas son consecuencias probables de la presencia de un mecanismo de purga muy eficiente de las repeticiones del DNA. También lo son de la pérdida de los mecanismos de silenciamiento por iRNA y RIP. El genoma de *U. maydis* se ha remodelado masivamente eliminando los intrones de sus genes. Todo lo anterior es probable que el hongo lo haya resuelto a través de su reconocido sistema de recombinación homóloga, el cual se caracteriza por ser altamente eficiente (Kamper *et al.*, 2006).

U. hordei y *S. reilianum* son dos hongos del carbón cuyo genoma también se encuentra disponible. Entre estos organismos, y *U. maydis*, se ha encontrado un grado alto de

homología y sintenia. *U. hordei* posee un sistema de apareamiento bipolar con dos loci *MAT* localizados en el cromosoma 1. De estos tres hongos, *U. hordei* es el que posee el genoma más grande (26.1 Mb), sin embargo, esto no se debe a que contenga un número mayor de genes, sino a la presencia de una gran cantidad de secuencias repetitivas y TEs. Particularmente, existe una densidad alta de secuencias repetitivas en la región cercana a los loci *MAT*. Por su parte, *S. reilianum* presenta un sistema de apareamiento tetrapolar, con tres alelos para el locus *a* (cromosoma 20) y 5 alelos para el locus *b* (cromosoma 1). El tamaño de su genoma es de 18.7 Mb y codifica para 6648 proteínas, aspectos en los cuales, es bastante similar a *U. maydis*. Tanto en *U. hordei*, como en *S. reilianum*, se encuentran los genes que codifican para la maquinaria del iRNA. En *U. hordei*, la actividad del iRNA se ha demostrado. En *S. reilianum*, la interrupción del gen que codifica para la proteína Dicer, no afecta la virulencia ni la aparición de los síntomas de la enfermedad en el maíz (Bakkeren *et al.*, 2008; Laurie *et al.*, 2012; Schirawski *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior, se considera que el último ancestro común de estos hongos fue tetrapolar, tuvo tres alelos diferentes de *a*, varios alelos de *b*, y albergaba la maquinaria del iRNA (Laurie *et al.*, 2013; Wollenberg y Schirawski, 2014). En *U. hordei*, el número de alelos de *a* y *b* disminuyó a dos combinaciones, debido al rearrreglo en sus cromosomas. Adicionalmente, en *U. hordei*, los TEs y las secuencias repetitivas se extendieron; estos elementos no solo guiaron la evolución del cromosoma sexual en este organismo, sino que contribuyeron a la duplicación de genes que codifican para efectores. En el caso de *U. maydis*, se perdió un alelo de *a*, mientras el número de alelos de *b* se incrementó por mutación y eventos de recombinación intralélica. Se considera que la configuración original de los cromosomas sexuales del último ancestro común es la que se encuentra en *S. reilianum* (Laurie *et al.*, 2012; Wollenberg y Schirawski, 2014). La pérdida de los genes del sistema de iRNA en *U. maydis* pudo ocurrir debido a la necesidad del hongo de mantener los virus que alberga, los cuales codifican proteínas que son tóxicas para otras levaduras, proporcionándole una ventaja en los nichos de crecimiento silvestres (Wollenberg y Schirawski, 2014).

Dentro de los genes de patogenicidad anotados en *U. maydis*, se encuentra solo un pequeño grupo que codifica para enzimas hidrolíticas, lo cual se ajusta al estilo de vida

biotrófico del hongo. Los patógenos biotróficos se caracterizan por minimizar el daño al hospedero, con el propósito de evitar la respuesta del sistema inmune y la muerte de la planta. En contraste, *U. maydis* cuenta con una gran cantidad de genes relacionados a proteínas de secreción (Kamper *et al.*, 2006; Wollenberg y Schirawski, 2014). De todas las proteínas que se expresan en *U. maydis*, 647 pueden ser potencialmente secretadas y de estas, 203 son proteínas que carecen de dominios estructurales y funcionales conocidos.

La composición del secretoma entre los patógenos *U. maydis*, *S. scitamineum*, *S. reilianum* y *U. hordei*, es similar. No obstante, al comparar estos secretomas con el de *Melanopsichium pennsylvanicum* (un hongo del carbón que infecta especies del género *Persicaria*), se encuentra que el de este último se encuentra sustancialmente disminuido. Lo anterior, puede ser una consecuencia de su adaptación a los hospederos dicotiledones. Estos cinco hongos del carbón comparten 72 familias *core* de proteínas secretadas con dominios conocidos, no obstante, también poseen proteínas de secreción específicas, probablemente relacionadas con las particularidades del proceso infectivo que desarrollan en sus hospederos respectivos (Lanver *et al.*, 2017). A lo largo del genoma de *U. maydis* se encontraron 12 grupos de genes agrupados (*clusters*) que codifican para proteínas de secreción, las cuales no tienen homólogos registrados en bases de datos, ni dominios funcionales conocidos. La interrupción de los 12 *clusters* provocaron fenotipos de virulencia alterada, demostrando la relación de los genes involucrados con la virulencia del hongo (Kamper *et al.*, 2006; Wollenberg y Schirawski, 2014).

Se sabe que los hongos son más cercanos a las células de los animales que a las de otros organismos. Los análisis del genoma y del proteoma de *U. maydis* demuestran que este hongo está relacionado más cercanamente a los humanos que a las levaduras. Si bien *S. cerevisiae* y *S. pombe* han proporcionado información valiosa a cerca de las bases moleculares del control del ciclo celular y de la remodelación de la cromatina, entre otros; existen varios procesos que no se llevan a cabo en los ascomicetos. Es el caso de la dinámica de la envoltura nuclear durante la mitosis abierta, el transporte celular a larga distancia y la organización motora basada en microtúbulos. *S. cerevisiae* y *U. maydis* comparten solo 541 genes para proteínas que no se encuentran en *Homo sapiens*. *U. maydis* y *H. sapiens* comparten 777 genes, mientras *S. cerevisiae* y *H. sapiens* solo 514

(Kamper *et al.*, 2006; Munsterkotter y Steinberg, 2007; Steinberg y Perez-Martin, 2008; Vollmeister *et al.*, 2012).

2.2.9 Epigenética

Existen relativamente pocos trabajos reportados relacionados con el estudio de los mecanismos de regulación epigenética en *U. maydis*; en contraste con la importancia que ésta área ha cobrado en los últimos años para la comprensión de la biología, la adaptación y la evolución de los organismos. Como ya se mencionó, *U. maydis* carece de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la metilación del DNA y el silenciamiento por iRNA, los cuales, junto con las modificaciones postraduccionales sobre las histonas, son los principales mecanismos de regulación epigenética en los eucariotas. La metilación del DNA y el silenciamiento por iRNA también se encuentran ausentes en *S. cerevisiae*. Las metiltransferasas de DNA son proteínas que se ha perdido en varios taxones de hongos.

Algunos autores han planteado que las principales fuerzas que conducen la evolución de la metilación del DNA son los TEs y el sexo. El sexo es la principal vía de esparcimiento de los TEs entre los organismos (Zemach y Zilberman, 2010). En el caso de *U. maydis*, es probable que el control de estos elementos se lleve a cabo a través de un mecanismo no descrito que involucra la actividad de su sistema de recombinación homóloga, por lo que puede prescindir de mecanismos adicionales (Kamper *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que existen reportes que indican la presencia de la 5mC en el genoma del hongo (aproximadamente 2.3% de citosinas metiladas) (Mishra *et al.*, 2011; Reynaga-Pena *et al.*, 1997), y ante la carencia de trabajos detallados destinados a confirmar la presencia o la ausencia de esta marca; no es posible descartar que alguna enzima aun no identificada pueda llevar a cabo esta actividad, de forma análoga a lo sucedido con las proteínas Dnmt5 y Rad8 (Huang *et al.*, 2016; Huff y Zilberman, 2014).

En *U. maydis* se han llevado a cabo algunos estudios destinados a conocer la función de los elementos que participan en la regulación de la cromatina, en la biología y virulencia del hongo. Reichmann *et al.* (2002), reportaron que la supresión del gen *HDA1* (ortólogo de *RPD3*) permite la expresión de un grupo de genes que normalmente se transcriben

específicamente en el estado dicarionte, durante la fase de crecimiento saprofítica (haploide). HdaI actúa como un co-represor específico. Aunque la mutante puede infectar la planta de maíz, el desarrollo del hongo se detiene en un paso anterior a la formación de las teliosporas (cariogamia), dando lugar a la formación de esporas inmaduras. Debido a lo anterior, la virulencia del hongo está disminuida. HdaI se requiere para la proliferación de las células diploides durante el desarrollo de las teliosporas (Reichmann *et al.*, 2002).

González-Prieto *et al.* (2014), encontraron que la mutación de *GCN5* en *U. maydis* genera una ligera reducción en la tasa de crecimiento del hongo, así como el desarrollo de la forma micelial de manera constitutiva, independientemente del pH u otras condiciones del medio de cultivo. La cepa mutante es incapaz de llevar a cabo la transición dimórfica y el fenotipo filamentoso no se revierte con la adición de cAMP. La capacidad para el apareamiento no está afectada. La ausencia de *GCN5* impide la invasión de las plantas de maíz y la formación de tumores, en tanto el crecimiento del micelio del hongo se restringe al sitio de inoculación (Gonzalez-Prieto *et al.*, 2014). El análisis transcriptómico de los genes regulados por *GCN5* permitió la identificación de 574 genes regulados positivamente y 629 genes regulados negativamente. 131 de estos genes se encuentran organizados en 41 *clusters*, de los cuales, 21 se han sido identificados como *clusters* de patogenicidad. La mayoría de los genes sobre-expresados durante la fase micelial están regulados negativamente por Gcn5 y la mayoría de los genes sobre-expresados en la fase de crecimiento levaduriforme, son sobre-expresados por Gcn5. Gcn5 se requiere para la expresión de genes asociados con el crecimiento levaduriforme y reprime los genes involucrados en el crecimiento micelial. Es por lo anterior que, ante la ausencia del gen correspondiente, el crecimiento del hongo es micelial constitutivo (Martinez-Soto *et al.*, 2015).

Elías-Villalobos *et al.* (2015), demostraron que la desacetilasa de histonas Hos2 es necesaria para la transición dimórfica y el desarrollo patogénico de *U. maydis*. La cepa mutante evidencia una notable reducción de la virulencia, con un incremento de 3 veces del número de plantas sin tumores, una disminución de 6 veces del número de plantas muertas y la disminución del tamaño de los tumores desarrollados. La interrupción de Hos2 incrementa los niveles de acetilación de H4K16 y es hipersensible a TSA. Al

aparearse las cepas mutantes de sexos opuestos sobre medio PDA con carbón activado, se observa una reacción Fuzz disminuida, respecto a la cruce de cepas silvestres. La reacción Fuzz empleando la cepa solopatógena SG200, que también alberga la mutación, está igualmente disminuida, por lo cual se deduce que existe un defecto luego de la fusión celular. Adicionalmente, la ausencia de Hos2 reduce la formación de tubos de conjugación en un 50%. Hos2 se une directamente a los genes de tipo de apareamiento. Las mutaciones de Hos1, Hos3, Hda2 y Clr3, no comprometen la virulencia ni el apareamiento (Elias-Villalobos *et al.*, 2015).

3 JUSTIFICACIÓN

La epigenética es un área de estudio que en los últimos años ha cobrado gran relevancia en la investigación de una amplia variedad de fenómenos biológicos, debido a que ofrece una perspectiva más completa de los mismos, particularmente de aquellos que involucran eventos de diferenciación celular y desarrollo. Las proteínas que participan de la remodelación de la cromatina son protagonistas fundamentales de la dinámica epigenética en las células, debido a que son las responsables del establecimiento, lectura, interpretación y remoción de las marcas sobre el DNA y la cromatina, así como de la ejecución de los cambios estructurales y funcionales sobre esta última, cambios que son necesarios para la expresión o el silenciamiento de los genes. Las proteínas remodeladoras de la cromatina en su conjunto, controlan la expresión génica y por lo tanto el fenotipo de los organismos.

La función particular de algunas de estas proteínas ha sido estudiada en varios modelos eucariotas, entre estos, algunos modelos fúngicos, sin embargo, se desconoce aun el rol que puedan cumplir muchas de ellas en organismos como *U. maydis*. Como ya se ha mencionado, *U. maydis* es un modelo con particularidades interesantes, que ofrece además ventajas para su estudio en el laboratorio. *U. maydis* es un hongo biótrofo, dimórfico, basidiomiceto, que genera la formación de tumaciones en los tejidos de la planta del maíz. Durante su ciclo de vida, atraviesa por una fase de crecimiento levaduriforme, saprofitica, haploide, seguida de una fase de crecimiento filamentosa, patogénica y dicariótica, que finaliza con la formación de esporas diploides. Las modificaciones morfológicas y moleculares necesarias para llevar a cabo estas transiciones, se encuentran bajo regulación epigenética. Es necesario investigar y describir los mecanismos epigenéticos que son importantes para que este organismo genere enfermedad.

Es por lo anterior que se ha considerado relevante la caracterización en el hongo, de los genes que codifican para proteínas remodeladoras de la cromatina cuya función no ha sido previamente investigada en *U. maydis*; principalmente desde su posible implicación en la

virulencia. Se pretende que la información derivada de este trabajo, sea un aporte al conocimiento de biología de *U. maydis* desde la perspectiva de la epigenética.

4 HIPÓTESIS

Existe una relación entre la función de algunas proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina y la virulencia de *Ustilago maydis*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre la función de algunas proteínas involucradas en la remodelación cromatina y la virulencia de *Ustilago maydis*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Revisar el estado del arte de la epigenética en organismos eucariotas.
2. Caracterizar un gen correspondiente a una proteína involucrada en la remodelación de la cromatina en *U. maydis*.
3. Caracterizar fenotípicamente cepas de *U. maydis* afectadas en el gen de estudio.
4. Determinar la participación del gen caracterizado en la virulencia de *U. maydis*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se partió de una exhaustiva revisión bibliográfica a cerca del estado del arte de la epigenética en los organismos eucariotas, con énfasis en los hongos y en *U. maydis*. A partir de esta revisión, se decidió emplear técnicas de ingeniería genética, biología molecular, bioinformática, microscopía, microbiología y fitopatología; con el propósito de caracterizar en ese organismo genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas y el regulador transcripcional Sin3. Para lo anterior, primero se identificaron los genes correspondientes en el genoma de *U. maydis*, y posteriormente se diseñaron y elaboraron casetes para su interrupción. Algunos de los casetes generados se emplearon para la transformación genética del hongo, obteniéndose cepas mutantes en al menos uno de los sexos de las cepas parentales empleadas (FB1, *a1b1* y FB2, *a2b2*). En algunos casos, la cepa mutante sexualmente complementaria se obtuvo a través del aislamiento de segregantes, luego la de infección de plantas de maíz con una mezcla de la cepa silvestre y mutante correspondiente. Siguiendo un procedimiento similar, se llevaron a cabo construcciones para la complementación de las mutaciones y se retro-transformó el hongo, obteniéndose las cepas complementadas respectivas. Nuevamente se siguió la estrategia de aislamiento de segregantes para la producción de cepas complementadas en ambos sexos. Una vez obtenidas las cepas mutantes y complementadas, se procedió a su caracterización fenotípica (morfología macroscópica y microscópica, crecimiento, sensibilidad a diferentes tipos de estrés, dimorfismo), y se evaluó su virulencia a través de ensayos de patogenicidad. Lo anterior se encuentra enmarcado en los objetivos planteados, y a continuación se describen con detalle los materiales y métodos que se utilizaron.

6.1 OBJETIVO 1

Revisar el estado del arte de la epigenética en organismos eucariotas.

Durante la revisión del estado del arte de la epigenética en los organismos eucariotas se emplearon las bases de datos del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la Universidad Autónoma de México (UNAM) y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Como criterios de búsqueda se incluyeron artículos y libros sobre epigenética, historia de la epigenética, mecanismos de regulación epigenética, metilación del DNA, modificaciones postraduccionales sobre las histonas, ncRNA, epigenética en la enfermedad, actualidad de la epigenética, epigenética en hongos, hongos fitopatógenos, epigenética en *Ustilago maydis*, clasificación de proteínas remodeladoras de la cromatina, clasificación de metiltransferasas de histonas en hongos, mutaciones de proteínas remodeladoras de la cromatina en hongos y en *U. maydis*, historia de *U. maydis*, clasificación de *U. maydis*, biología y ciclo de vida de *U. maydis*, genética de *U. maydis*, genoma de *U. maydis*. En varios casos se buscaron las publicaciones más recientes de cada área, y a partir de ahí, se llevó a cabo una búsqueda retrospectiva de información. Se colectaron aproximadamente 900 artículos a cerca de estos temas.

Una parte de la información recolectada se utilizó para la elaboración de un artículo de revisión de tema. Gran parte de la información restante se incluyó en el marco teórico del presente trabajo.

6.2 OBJETIVO 2

Caracterizar un gen correspondiente a una proteína involucrada en la remodelación de la cromatina en *U. maydis*.

6.2.1 Cepas de trabajo y condiciones de cultivo

En este estudio se emplearon las cepas FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*) (Banuett y Herskowitz, 1989), y SG200 (*a1mfa2bE1/bW2*) de *U. maydis* (Bölker *et al.*, 1995), así como las cepas mutantes derivadas obtenidas. El cultivo de *U. maydis* se realizó principalmente en medio **YEPSL** (sacarosa, 10 g/l; extracto de levadura, 4 g/l; peptona, 4 g/l) (Brachmann *et al.*,

2001), a 28 °C, 200 rpm, 18-20 h; sin embargo, también se emplearon los medios **medio mínimo** (MM: glucosa, 10 g/l; KNO₃, 3 g/l; solución de sales, 62.5 ml/l; agar-agar, 2%. Solución de sales: KH₂PO₄, 16 g/l; Na₂SO₄, 4 g/l; KCl, 8 g/l; MgSO₄, 2 g/l; CaCl₂, 1 g/l; H₃BO₃, 0.06 g/l; MnCl₂·4H₂O, 0.14 g/l; ZnCl₂, 0.4 g/l; NaMoO₄·H₂O, 0.04 g/l; FeCl₃·6H₂O, 0.1 g/l; CuSO₄·5H₂O, 0.4 g/l) líquido y sólido (agar-agar, 2%), y **medio completo** sólido (MC: glucosa, 10 g/l; caseína, 0.25%; extracto de levadura, 0.1%; NH₄NO₃, 0.15%; solución de sales, 62.5 ml/l; agar-agar, 2%) a 28 °C, 48-72 h (Holliday, 1974). Otros medios sólidos usados fueron **YPD** (glucosa, 20 g/L; extracto de levadura, 10 g/L; peptona, 20 g/L, agar-agar, 15 g/L) y **PDA** (MCD-LAB). Para los ensayos de reacción Fuzz, se empleó agar **PDA con carbón activado** al 2% (Holliday, 1974). Las transformaciones con productos de clonación se realizaron en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -) (Invitrogen) (Raleigh *et al.*, 1988). La propagación de *E. coli* DH5 α se realizó en medio **LB** (DIBICO), 37 °C, 200 rpm, 18 h y en agar LB (CONDA), 37 °C, 18-24 h. Para los ensayos de transformación genética de *U. maydis* se utilizó **RegAgar** (extracto de levadura, 10 g/l; peptona, 20 g/l; sacarosa, 20 g/l; sorbitol, 1 M; agar-agar, 15 g/l) a 28 °C, por 4-7 días (Schulz *et al.*, 1990).

6.2.2 Reacción Fuzz

Los ensayos de reacción Fuzz se realizaron de dos formas: a partir de células de colonias de las cepas a contrastar, y a partir de células obtenidas a partir de cultivos en medio líquido. En el primer caso, se sembraron las cepas a evaluar por técnica de agotamiento (Rojas-Triviño, 2011) sobre agar YPD a 28 °C por 48 h. Se tomó una colonia aislada de cada cepa y se resuspendió en 100 μ l de agua desionizada estéril. Se realizaron mezclas de a dos cepas hasta agotar todas las combinaciones posibles, empleando volúmenes iguales de cada una. Se plaquearon gotas de 15 μ l de las suspensiones individuales y de las mezclas sobre agar PDA con carbón activado al 2%. Se incubó a 21 °C por 24-48 h y se evaluó la presencia o ausencia de micelio blanquecino sobre cada una de las gotas sembradas. De otra parte, se inocularon 5 ml de medio YEPSL con colonias aisladas de las cepas a contrastar, y se incubaron a 28 °C por 24-48 h, 200 rpm. Se recuperaron las

células por centrifugación (3500 rpm, 15 min) y se lavaron dos veces. Para cada una de las cepas se ajustó un inóculo a $OD_{600} = 0.8-1$ (DU 650 Spectrophotometer, Beckman Coulter, USA) y se prepararon las mezclas entre estas como se mencionó anteriormente. Se plaquearon gotas de 15 μ l de las suspensiones individuales y de las mezclas sobre agar PDA con carbón activado al 2%. Se incubó a 21 °C por 24-48 h y se evaluó la presencia o ausencia de micelio blanquecino sobre cada una de las gotas sembradas (reacción Fuzz positiva o negativa, respectivamente) (Banuett y Herskowitz, 1989; Holliday, 1974; Kamper, 2004).

6.2.3 Plásmidos utilizados

Para la elaboración de las construcciones de interrupción de los genes de interés, se utilizó el plásmido pBS-hhn (4773 pb) (Kamper, 2004), el cual alberga un casete con el marcador de resistencia a higromicina (*hph*, higromicina fosfotransferasa) bajo el control del promotor *hsp70* y del terminador *nos* (*Agrobacterium*). Este casete se encuentra flanqueado por dos sitios de restricción *Sfi* I, con secuencias de reconocimiento diferentes: *Sfi* I (a) **GGCCATCTAGGCC**, al inicio de la secuencia promotora y *Sfi* I (b) **GGCCTGAGTGGGCC**, al final de la secuencia terminadora. El casete con el marcador de selección puede ser liberado por digestión con la enzima *Sfi* I, generándose en cada extremo terminaciones que no son compatibles entre sí.

En la elaboración de las construcciones de complementación se empleó el plásmido pBS-Cbx (4786 pb) (Keon *et al.*, 1991), el cual contiene el marcador de resistencia a la carboxina (alelo ipR del gen *Cbx* de *U. maydis*). Este casete se encuentra igualmente flanqueado por los sitios *Sfi* I ya señalados.

6.2.4 Preparación de células competentes

La preparación de células competentes para la transformación de *E. coli* se llevó a cabo por el método de $CaCl_2$. Para esto, se inocularon 5 ml de medio LB con una colonia de *E. coli* DH5 α , y se incubó a 37 °C, 250 rpm, toda la noche. A partir del cultivo de 5 ml, se

inocularon 250 ml de caldo LB y se incubó a 37 °C, 200 rpm, hasta alcanzar $OD_{600} = 0.2$ (aproximadamente 2 h) (DU 650 Spectrophotometer, Beckman Coulter, USA). Las células se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min, a 4 °C; el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 125 ml de $CaCl_2$ 50 mM, estéril y frío (4 °C). La suspensión se colocó en hielo por 20 min y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado cuidadosamente en 20 ml de $CaCl_2$ 50 mM, estéril y frío. Las células se mantuvieron a 4 °C (en hielo) por 4 h. Finalmente, se adicionaron 7 ml de glicerol al 50% y se dispensó el volumen total en alícuotas de 100 μ l, en tubos eppendorf. Los viales se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso (Comunicación personal: González-Prieto).

6.2.5 Transformación genética de *E. coli*

Se descongeló en hielo un tubo con 100 μ l de células competentes DH5 α , previamente almacenadas a -80 °C. Se le adicionó 5-10 μ l de DNA transformante (1-50 ng de DNA), se mezcló suavemente el contenido dando golpes suaves en la pared del tubo y se incubó en hielo por 20 min. A continuación, las células fueron sometidas a un choque térmico por 60 seg a 42 °C, en termobloque. El vial se removió del termobloque y se incubó nuevamente en hielo por espacio de 2-10 min, posteriormente se le añadieron 400 μ l de medio LB y se colocó en agitación a 250 rpm, 37 °C, por 1 h. Se llevaron a cabo diluciones seriadas 1:10 con agua desionizada estéril, y se plaquearon 100 μ l de cada dilución sobre la superficie de cajas de agar LB con antibiótico (ampicilina: 100 μ g/ml; kanamicina: 100 μ g/ml). Las cajas se incubaron a 37 °C por 16-18 h. Las colonias resultantes fueron seleccionadas por picadura y propagadas en medio selectivo para la extracción de DNA plasmídico y su confirmación por digestión enzimática. Las clonas corroboradas se propagaron y se almacenaron con glicerol al 50%, a -80 °C (González-Prieto, 2003; Sambrook y Rusell, 2001).

6.2.6 Extracción de DNA plasmídico

Las extracciones de DNA plasmídico se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes de NucleoSpin Plasmid Easy Pure (MACHEREY-NAGEL), Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) y Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

6.2.7 Identificación de los genes de estudio en el genoma de *U. maydis*

Los genes que codifican para HKMTs, PRMTs y el regulador transcripcional Sin3, se identificaron empleando lo reportado por Brosch et al. (2008) y Pham et al. (2015), así como la información depositada en las plataformas de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y MUMDB (MIPS Ustilago maydis Database). La identidad de las accesiones obtenidas fue corroborada en base a su homología con las proteínas reportadas previamente para *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *N. crassa* y *M. oryzae*, utilizando el programa BLAST 2.2.25 (Basic Local Alignment Search Tool), Protein BLAST; así como por la presencia de los dominios característicos de cada familia de proteínas, de acuerdo a Murcia-Garzón (2016). De la misma forma, se llevó a cabo la búsqueda de homólogos en otros hongos y se procedió a la construcción de filogenias para HKMTs y PRMTs por el método de máxima verosimilitud, modelos WAG+G y LG+G, respectivamente, bootstrap de 1000, en el programa MEGA 7.0.26.

6.2.8 Extracción de DNA genómico

La obtención del DNA genómico de *U. maydis* se llevó a cabo por el método modificado de Hoffman y Winston (1987). Se preparó un cultivo fresco del hongo en 10 ml de medio líquido (16-18 h de incubación, 28 °C, 200 rpm) y se colectaron las células por centrifugación (3600 rpm, 15 min). La biomasa obtenida se resuspendió en 0.5 ml de agua desionizada estéril y se transfirió a un tubo eppendorf (1.7 ml) para su centrifugación (13000, 1 min), se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0.2 ml de

solución de lisis (tritón X-100, 2%; SDS, 1%; NaCl, 0.1 M; Tris-HCl pH 8, 10 mM; EDTA, 1 mM), se les añadieron 0.2 ml de fenol-cloroformo (1:1) y 0.3 g de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (bioWORLD). Se agitó el tubo en vórtex por 1 min y se dejó reposar en hielo por el mismo tiempo. Esta operación se repitió 3 veces. Se adicionaron 0.2 ml de TE 10:1 (Tris, 10 mM; EDTA, 1 mM) y se centrifugó el contenido (12000 rpm, 10 min). La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, se le incorporaron 30 µg de RNasa a, y se incubó por 5 min a 37 °C. A continuación, se agregaron 10 µl de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol 100%. El tubo se mezcló por inversión, se dejó reposar 15 min a -20 °C y se centrifugó (12000 rpm, 5 min). El sobrenadante se descartó y el precipitado se secó a 55 °C por 1-5 min. El DNA obtenido se resuspendió en 30 µl de TE 10:1 1X y se almacenó a -20 °C (González-Prieto, 2003; Hoffman y Winston, 1987).

6.2.9 Elaboración de casetes de interrupción para la mutación de genes que codifican para HKMTs, PRMTs y Sin3

La construcción de los casetes para la interrupción de los genes de estudio se realizó según la metodología modificada de Kämper (2004). Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos destinados a la amplificar por PCR de 1000 pb de las secuencias promotoras y terminadoras inmediatamente adyacentes a los ORFs de los genes *SUV39*, *SET1*, *SET2A*, *SET2B*, *DOT1*, *PRMT1*, *PRMT3*, *PRMT4* y *SIN3* (bordes). Los oligonucleótidos reversos de los promotores, y sentido de los terminadores, albergan sitios de restricción para *Sfi* I con secuencias de reconocimiento diferentes, **GGCCATCTAGGCC** y **GGCCTGAGTGGCC**, respectivamente. La amplificación de los bordes se llevó a cabo en el DNA genómico de la cepa FB1 (*alb1*), siguiendo un programa de 98 °C/30 seg x 1 repetición; 98 °C/10 seg, 62 °C/10 seg, 72 °C/15 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; empleando DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y posteriormente se clonaron en el vector pCR Blunt II TOPO (Invitrogen), transformándose en células de competentes *E. coli* *DH5α*. Luego del escrutinio inicial de las clonas obtenidas en medio LB con kanamicina,

la verificación de la orientación de los insertos se realizó por secuenciación (M13 sentido, 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; M13 reverso, 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer) y digestión enzimática. Los bordes se liberaron digiriendo los plásmidos con una enzima con corte en el sitio de clonación múltiple, y la enzima *Sfi* I (New England Biolabs, Thermo Scientific). Las bandas con tamaño aproximado de 1000 pb se purificaron a partir del gel de agarosa (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) y se midió su concentración (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

El plásmido pBS-hhn se digirió con la enzima *Sfi* I, obteniéndose el casete con el marcador de selección de resistencia a la higromicina (1884 pb). La banda correspondiente fue purificada a partir del gel de agarosa. La pareja de promotor y terminador de cada gen se ligó al casete con el marcador de selección (T4 DNA ligasa, New England Biolabs). El producto de la ligación se amplificó por PCR utilizando cebadores anidados que parten de la región promotora y terminadora de los genes de trabajo. Las construcciones se verificaron por digestión con la enzima *Sfi* I y se clonaron en el vector pCR Blunt II TOPO. Durante todo el proceso se utilizó el programa Clone Manager Professional Suite 8.

6.2.10 Síntesis de protoplastos de *U. maydis*

La generación de protoplastos de *U. maydis* se realizó siguiendo el protocolo modificado de Schulz *et al.* (1990). Se prepararon cultivos de las cepas de *U. maydis* en 2 ml de medio YEPSL, a 28 °C, 200 rpm, 18-20 h. A continuación, se realizaron diluciones de los cultivos 1:300 en 50 ml de YEPSL y se dejó crecer toda la noche. Cuando el cultivo alcanzó OD₆₀₀= 0.5-0.8, se centrifugó en tubos falcon por 10 min a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 25 ml de SCS (sorbitol, 1 M; citrato de sodio, 20 mM, pH 5.8), se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se preparó una solución de Glucanex al 5% (enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*, SIGMA-ALDRICH, L1412-5G) en SCS y se esterilizó por filtración. Las células de *U. maydis* se resuspendieron en 2 ml de solución de Glucanex 5% y se incubaron a temperatura ambiente (21-23 °C) hasta que aproximadamente el 50% de las células

adoptaron una morfología redonda (15-20 min). Los protoplastos se colocaron en hielo y se les añadieron 10 ml de SCS frío (4 °C). Se centrifugaron a 2400 rpm, 4 °C, por 10 min, y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió cuidadosamente en 10 ml de SCS frío, y se centrifugó la suspensión a 2400 rpm, 4 °C, por 10 min; se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más. El precipitado se resuspendió en 10 ml de STC (sorbitol, 1 M; Tris-HCl pH 7.5, 10 mM; CaCl₂, 100 mM) frío (4 °C) y la suspensión se centrifugó a 2400 rpm, 4 °C, por 10 min; se descartó el sobrenadante. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron cuidadosamente en 500 µl de STC frío, se colocaron en hielo y se alicuotaron en tubos eppendorf a volumen de 70 µl para su almacenamiento a -80 °C (Schulz *et al.*, 1990).

6.2.11 Obtención y preparación de las construcciones de interrupción para transformación

Los casetes de interrupción de los genes de trabajo se amplificaron por PCR, empleando el DNA de los plásmidos donde previamente se clonaron (pCR Blunt II TOPO). Para esto se siguió un programa de 98 °C/30 seg x 1 repetición; 98 °C/10 seg, 62 °C/10 seg, 72 °C/60 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; utilizando DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific), así como las parejas de oligonucleótidos anidados de cada gen. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 0.8%. En los casos en que fue necesario, la banda correspondiente a la construcción (aproximadamente 4000 pb) fue purificada a partir del gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen). Se llevó a cabo amplificación por PCR hasta que se obtuvieron 5 µg de DNA de cada casete, para cada cepa a transformar (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Este DNA se precipitó utilizando 0.1 vol de NaOAc 3 M y 2.5 vol de etanol 100%, almacenando la mezcla a -20 °C por 20 min. El contenido se centrifugó por 20 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 2.5 vol de etanol 70%. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Se adicionaron 10 µl de TE, se mezcló el vial y se colocó a 50 °C por 20 min. Se centrifugó rápidamente (*spin*) y se almacenó a -20 °C hasta su uso (Kamper, 2004).

6.2.12 Transformación genética de *U. maydis*

La transformación genética del *U. maydis* se realizó siguiendo el protocolo modificado de Schulz (1990), empleando protoplastos, y 5 µg de DNA de cada construcción, por reacción de transformación. Se preparó RegAgar en dos erlenmeyers diferentes. Luego de su esterilización por autoclave, se dejó enfriar el agar de uno de los erlenmeyers hasta alcanzar una temperatura de 60 °C. Se le adicionó el antibiótico correspondiente al doble de la concentración final (higromicina: 300 µg/ml; carboxina: 16 µM) y se vertieron 10 ml de agar con antibiótico sobre cajas de Petri. Seguido de esto, se descongeló en hielo un vial con protoplastos previamente almacenados a -80 °C. A las cajas Petri se les adicionó una segunda capa de RegAgar (60 °C) a partir del erlenmeyer con agar sin antibiótico. A los protoplastos descongelados se les incorporaron 1 µl de heparina (15 mg/ml) y 10 µl de DNA. De igual forma, se adicionaron 0.5 ml de STC/PEG 40%, se mezcló pipeteando suavemente 2 veces y se incubó la reacción en hielo por 15 min. Se plaqueó el contenido total de cada vial sobre el RegAgar preparado, se dejó secar, y se incubaron las cajas a 28 °C por 4 días (Schulz *et al.*, 1990). Las clonas obtenidas se propagaron en medio selectivo para la extracción de DNA genómico (Hoffman y Winston, 1987) y posterior verificación.

6.2.13 Verificación de las clonas transformantes

La verificación de la transformación genética de *U. maydis* se llevó a cabo por PCR (Kamper, 2004) y Southern blot (Sambrook y Rusell, 2001; Southern, 2006). Primero, se elaboraron dos parejas de oligonucleótidos para cada gen evaluado; una de estas se diseñó hacia la región 5', y la otra, hacia la región 3' del sitio esperado de recombinación homóloga del casete insertado, en el genoma del hongo. Ambas parejas de iniciadores abarcan un área que incluye parte del marcador de selección (gen de resistencia a la higromicina) y una región externa al sitio de recombinación homóloga (en total aproximadamente 2000 pb). Se siguió un programa de 96 °C/2 min x 1 repetición; 95 °C/30 seg, 58 °C/30 seg, 72 °C/2 min, 15 seg x 32 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; utilizando GoTaq® DNA Polimerasa (Promega). La clonas en cuyo DNA se

consiguió la amplificación de los dos fragmentos, se seleccionaron para confirmación por Southern blot.

Para cada gen se realizó un análisis de restricción sobre la secuencia adyacente al sitio esperado de inserción de la construcción, en el genoma del hongo (Clone Manager Professional Suite 8). Lo anterior, con el propósito de seleccionar enzimas que al digerir el DNA de las cepas silvestres y de las transformantes, su patrón de corte permita diferenciar claramente una región que alberga el gen intacto, de una región que alberga el casete de interrupción. En el caso del gen *Sin3*, se llevaron a cabo dos análisis de restricción. Asimismo, se estableció como sonda para cada gen su promotor (presente tanto en las cepas silvestres, como en las mutantes), seguido por una porción del 5' del ORF correspondiente (presente únicamente en las cepas silvestres), con tamaño aproximado de 1500 pb. Para lo anterior, se emplearon los oligonucleótidos anidados sentido diseñados previamente, localizados en los promotores de los genes; así como nuevos iniciadores reversos que parten del cuerpo de los genes. Se amplificaron las sondas por PCR, siguiendo un programa de 98 °C/30 seg x 1 repetición; 98 °C/15 seg, 64 °C/15 seg, 72 °C/20 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; empleando DNA de la cepa FB1 (*alb1*) y DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 0.8%.

En un primer ensayo, el producto de PCR correspondiente a la sonda del gen *Sin3* se digirió con la enzima *EcoR* I, para la selección de un fragmento de interés. Posteriormente, se empleó el producto de PCR completo como sonda, de igual forma que en los otros casos. Las sondas se purificaron (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega; PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) y se estableció su concentración (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). El marcaje de las sondas y el establecimiento de la eficiencia de este, se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter II (Roche) (digoxigenina). Las sondas se almacenaron a – 20 °C, hasta el momento de su uso.

Se digirieron 15-20 µg de DNA de la cepa FB1 (*alb1*) y de las cepas transformantes, utilizando las enzimas seleccionadas. La digestión completa del DNA se verificó por

electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El DNA se precipitó con etanol (ver numeral 6.2.11) y se llevó a un volumen final de 20 μ l, cantidad que se cargó por completo en un nuevo gel de agarosa al 0.8% para electroforesis. La corrida se visualizó en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Universal Hood II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) colocando una regla a lo largo del gel para tener registro de la medida del mismo, así como de la localización en cm de las bandas del marcador de peso molecular utilizado. El gel se sumergió completamente en una solución de desnaturalización (NaCl, 1.5 M; NaOH, 0.5 M) por 15-30 min, en constante balanceo. Posteriormente, el gel se introdujo en una solución neutralizante (NaCl, 3 M, Tris-HCl, 0.5 M, pH 7.0) por 15-30 min, en constante balanceo. El gel se lavó con agua desionizada estéril y se preparó para la transferencia del DNA a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Para esto se realizó el montaje de un sistema conformado por un soporte rodeado por solución de transferencia SSC 20X (NaCl, 3 M; citrato de sodio, 0.3 M); sobre el soporte se colocó una pieza de papel filtro (Whatman 3mm) del ancho del soporte y con la longitud suficiente para que sus bordes se sumerjan en la solución de transferencia. Toda la superficie de la pieza de papel filtro se empapó con solución SSC 20X. Aparte, se cortó otra pieza de papel filtro, así como la membrana de nylon, ambos con el tamaño exacto del gel. Se sumergieron en SSC 2X y se dejaron flotar en la superficie de la solución, para evitar que el aire quede atrapado durante la transferencia. Se colocó el gel sobre la superficie del papel filtro que cubre el soporte, y sobre éste, la membrana de nylon, de forma que no se formen burbujas entre el gel y la membrana. Sobre la membrana se ubicó la pieza de papel filtro restante, y posteriormente una columna de papel absorbente con un grosor aproximado de 10 veces el gel. Finalmente se colocó un cristal y peso para garantizar la homogeneidad de la transferencia. El tiempo de transferencia fue de toda la noche, hasta que el gel quedó reducido a una película fina.

Luego de desmontar el sistema de transferencia, el gel se retiró junto con la membrana, se les dio la vuelta y con un lápiz, a través del gel, se marcaron sobre la membrana cada uno de los pozos. Se realizó una pequeña muesca en el borde de la membrana para identificar la cara que estuvo en contacto directo con el gel. Se separó el gel de la membrana y este se visualizó en el fotodocumentador (Gel Doc™ XR System, Universal Hood II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con el propósito de corroborar la transferencia total del DNA. La

membrana se sumergió en SSC 2X por 10-20 min y se colocó sobre papel filtro (Whatman 3mm) empapado con SSC 10X, para su fijación por UV-Crosslinking (Stratalinker® UV Crosslinker 1800, CA, USA). Para esto se emplearon dos pulsos en el modo *Autocrosslink* (120000 microjoules/cm², 25-50 seg), directamente sobre la cara de la membrana que contenía los ácidos nucleicos. Posteriormente, la membrana se colocó sobre papel filtro seco y se introdujo en un horno microondas por 2 min a máxima potencia (Angeletti *et al.*, 1995). La pre-hibridación, la hibridación y el revelado de la membrana (detección de quimioluminiscencia por inmunoensayo enzimático) se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante del kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter II (Roche). Se utilizaron temperaturas de hibridación de 55 y 65 °C, toda la noche. Se identificaron las cepas mutantes verdaderas por la presencia de una señal única sobre una banda con el tamaño esperado, de acuerdo al análisis de restricción. Las cepas mutantes identificadas se propagaron y preservaron por ultracongelación (- 80 °C) en glicerol al 50%.

6.2.14 Aislamiento de segregantes

En los casos en los cuales no fue posible la obtención de mutantes en ambos sexos, se procedió al aislamiento de segregantes a partir de tumores maduros. Para esto, se infectaron plántulas de maíz de las variedades Cacahuaxintle y Golden Bantam (Jungseed, WI, USA), con una mezcla de las cepas mutantes y silvestres, u otras, según el caso (ver apartado 6.4.1). Para lo anterior, se siguió lo reportado por González-Prieto *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Los tumores maduros se removieron de las plantas de maíz, se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (Cloralex, 5.4%) por 3 min y posteriormente con etanol al 70% por 5 min. Se lavaron con agua desionizada estéril dos veces por 5 min y se maceraron en un mortero. Las teliosporas se resuspendieron en una solución de CuSO₄ al 0.5% por 1 h (agitación 200 rpm), se filtraron (toalla de tela Magitel) y se centrifugaron (3500 rpm, 15 min). Las teliosporas obtenidas se lavaron dos veces por centrifugación con agua desionizada estéril (3500 rpm, 15 min) y se resuspendieron en una solución de antibióticos (ampicilina: 100 µg/ml; kanamicina: 100 µg/ml). A partir de la suspensión de teliosporas, se inoculó medio YEPSL suplementado con el antibiótico

para selección (higromicina/carboxina). Se incubó a 28 °C, 48-72 h, en agitación a 200 rpm, y se diluyó seriadamente en base 10. Se plaquearon alícuotas de 100 µl de cada dilución en agar YPD suplementado con el antibiótico de selección y se incubó a 28 °C, 48 h. Se llevó a cabo el escrutinio de las clonas, su propagación en medio selectivo y la extracción del DNA genómico (Chavez-Ontiveros *et al.*, 2000; Gonzalez-Prieto *et al.*, 2014; Hoffman y Winston, 1987).

6.2.15 Identificación de segregantes

La identificación de segregantes se llevó a cabo por reacción Fuzz (ver apartado 6.2.2) y PCR (GoTaq® DNA Polimerasa, Promega; Phusion High-fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific), amplificando regiones de los genes *pra1*, *pra2*, *bW1*, *bW2* y *hph* (higromicina fosfotransferasa), a partir del DNA de las clonas seleccionadas (Gonzalez-Prieto *et al.*, 2014). Para lo anterior, se utilizaron los siguientes iniciadores: TESTPRA1S, 5'-CGTGGCTCTGGGTTCTACTTG-3'; TESTPRA1R, 5'-GACGAGGCTTGCTGGATACTG-3'; TESTPRA2S, 5'-TGCGAGATCGCCAGCATTGAG-3'; TESTPRA2R, 5'-TGGCGGTTTGTGCCCCTACAC-3'; Umbw1S, 5'-CTTGGTATAGGTAGCGT-3'; Umbw1R, 5'-TCTCTGGGTTACGGTAA-3'; Umbw2S, 5'-GGCCACGGGGTGAACGGT-3'; Umbw2R, 5'-GTGGGGTTCAGGGGGAG-3'; HphS, 5'-ATGGAAAAGCCTGAACTCAC-3' y HphR, 5'-CTATTCCTTTGCCCTCGG-3' (Comunicación personal: González-Prieto). Se siguieron los siguientes programas: *pra1*/ 96 °C/3 min x 1 repetición; 95 °C/30 seg, 62 °C/30 seg, 72 °C/24 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; *pra2*/ 96 °C/3 min x 1 repetición; 95 °C/30 seg, 62 °C/30 seg, 72 °C/35 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; *bW1*/ 96 °C/3 min x 1 repetición; 95 °C/30 seg, 56 °C/30 seg, 72 °C/17 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; *bW2*/ 96 °C/3 min x 1 repetición; 95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/17 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α; *hyg*/ 98 °C/30 seg x 1 repetición; 98 °C/15 seg, 60 °C/15 seg, 72 °C/17 seg x 35 repeticiones; 72 °C/5 min x 1 repetición; 4 °C α. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 0.8%. En el caso de las cepas con genotipo *alb1*, se

esperaba amplificación únicamente con los iniciadores de *pra1* (396 pb) y *bW1* (267 pb), y en el caso de las cepas con genotipo *a2b2*, amplificación únicamente con los iniciadores de *pra2* (579 pb) y *bW2* (267 pb). Si se trataban de cepas que albergaban los casetes de interrupción, debían adicionalmente exhibir la amplificación del gen *hph* (1026 pb). De esta forma se seleccionaron las cepas de sexo complementario faltantes y se preservaron por ultracongelación (-80 °C) en glicerol al 50%.

6.2.16 Elaboración de construcciones para la complementación de las cepas mutantes

Los genes silvestres completos a ser re-introducidos se amplificaron por PCR empleando DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). Para esto, se utilizaron los iniciadores anidados previamente diseñados para la amplificación de los casetes de interrupción (ver apartado 6.2.9). Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pCR Blunt II TOPO (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se propagaron en *E. coli* DH5 α y se extrajo el DNA plasmídico (NucleoSpin Plasmid Easy Pure, MACHEREY-NAGEL). Paralelamente, también se llevó a cabo la propagación del plásmido pBS-Cbx y la extracción del DNA plasmídico (NucleoSpin Plasmid Easy Pure, MACHEREY-NAGEL), para su digestión con las enzimas *Not* I (Thermo Scientific) o *Stu* I (Thermo Scientific), las cuales permiten la escisión del casete de resistencia a carboxina (1898 pb). La digestión se visualizó en gel de agarosa al 0.8%, y la banda correspondiente al casete de resistencia a carboxina fue purificada (1898 pb) (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Los plásmidos que albergaban los genes completos se linealizaron con las enzimas *Not* I y *Sma* I, según el caso, y se desfosforilaron (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP), New England Biolabs). A continuación, se ligó el casete de resistencia a carboxina con cada uno de los plásmidos abiertos, a través de los sitios de restricción compatibles (T4 DNA ligasa, New England Biolabs) y el producto circularizado se introdujo en *E. coli* DH5 α . Una vez identificadas las clonas con las construcciones correctas, se propagaron, y se extrajo el DNA plasmídico (NucleoSpin Plasmid Easy Pure, MACHEREY-NAGEL).

6.2.17 Retrotransformación de las cepas mutantes con los casetes de complementación

Para la complementación de las cepas mutantes, primero se llevó a cabo la preparación de los protoplastos, de acuerdo a lo especificado en el apartado 6.2.10 (Schulz *et al.*, 1990). Posteriormente, los plásmidos que albergan las construcciones de interrupción se linealizaron con la enzima *Ssp I*, la cual tiene un sitio de corte único al interior del casete de carboxina. La retrotransformación se realizó siguiendo los pasos señalados en el apartado 6.2.12, utilizando 5 µg de cada plásmido abierto (Schulz *et al.*, 1990). La concentración de carboxina empleada para la selección de las clonas transformantes fue de 16 µM, junto con higromicina a 300 µg/ml. La comprobación de las clonas obtenidas se realizó a través de la amplificación por PCR del gen silvestre, utilizando los oligonucleótidos anidados con los cuales se amplificó previamente la totalidad de cada uno de los genes. De igual forma, se amplificó el gen que codifica para la higromicina fosfotransferasa (ver apartados 6.2.9 y 6.2.15). En los casos en los que no fue posible complementar las cepas mutantes en ambos sexos, se siguió el procedimiento para aislamiento de segregantes especificado en el apartado 6.2.14, infectando plántulas de maíz con mezclas de cepas mutantes y complementadas. El sexo de las segregantes se estableció de acuerdo al apartado 6.2.15, aislándose de esta forma la cepa complementaria faltante (Chavez-Ontiveros *et al.*, 2000; Gonzalez-Prieto *et al.*, 2014). Las cepas complementadas se preservaron por ultracongelación (-80 °C) en glicerol al 50%.

6.3 OBJETIVO 3

Caracterizar fenotípicamente cepas de *U. maydis* afectadas en el gen de estudio.

6.3.1 Morfología

Las cepas mutantes se reactivaron a partir de los viales almacenados en ultracongelación, utilizando medio YEPSL a 28 °C, 200 rpm, por 24 h. A partir de éste cultivo se llevó a

cabo una nueva siembra en medio YEPSL a 28 °C, 200 rpm, 18 h, y posteriormente siembras por técnica de agotamiento (Rojas-Triviño, 2011) en agar YPD a 28 °C, 72 h, con el propósito de observar la morfología colonial. La morfología microscópica se verificó por microscopia de campo claro (Leica DM750, Leica ICC50 HD, Heerbrugg, Suiza), contraste de fase (Olympus BX51, Tokio, Japón) y DIC (Leica DMRE, Heerbrugg, Suiza), a partir de las colonias y los cultivos en medio líquido.

6.3.2 Coloración con calcofluor blanco

Se prepararon cultivos frescos de *U. maydis* en YEPSL a 28 °C, 200 rpm, por 18 h. Se colectaron las células por centrifugación a 13000 rpm por 3 min y se lavaron dos veces con agua desionizada estéril, centrifugando la biomasa a 13000 rpm por 3 min y descartando el sobrenadante cada vez. Las células se homogenizaron en 100 µL de agua desionizada estéril y se adicionó a la suspensión 1 µL de blanco de calcofluor 1 g/L (Sigma). Las células se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y se lavaron 3 veces por centrifugación (13000 rpm por 3 min). Finalmente, se resuspendieron en un volumen final de 100 µL y se observó la fluorescencia (Leica DMRE, Heerbrugg, Suiza).

6.3.3 Cinética de crecimiento en MM

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento conservativas por triplicado en medio mínimo líquido, en las cuales se midió el crecimiento por absorbancia en los tiempos 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 h. Para cada cepa se partió de un pre-inóculo en 5 ml de medio YEPSL, 28 °C, 150 rpm, 18 h de incubación, del cual se tomó 1 ml para la inoculación de 10 ml de medio YEPSL que se incubó a 28 °C, 150 rpm, por 18 h. Este cultivo se utilizó como inóculo de la prueba, partiendo con aproximadamente con 1 E+05 células/ml en 120 ml de volumen final. Los cultivos se mantuvieron a 28 °C, 150 rpm, hasta el final de la prueba.

6.3.4 Ensayo de crecimiento relativo en agar

Se centrifugaron cultivos de *U. maydis* preparados en medio YEPSL a 28 °C, 200 rpm, por 24 h; para la recuperación de la biomasa celular. La biomasa obtenida se lavó dos veces por centrifugación (3500 rpm, 15 min) y se resuspendió al volumen inicial en agua desionizada estéril. Se determinó la concentración celular de las suspensiones por conteo en cámara de Neubauer, y se prepararon inóculos a una concentración de 1×10^7 células/ml. Se verificó que la absorbancia de los inóculos fuera cercana a 0.5 (DU 650 Spectrophotometer, Beckman Coulter, USA). Se llevaron a cabo diluciones seriadas en base 10 con agua desionizada estéril y se plaqueó una gota de 10 μ l de cada una sobre el agar seleccionado. Los cultivos se incubaron a 28 °C por 48-72 h y se comparó el crecimiento entre las cepas sembradas (Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997).

6.3.5 Transición dimórfica por pH

La evaluación de la transición dimórfica por pH se realizó de acuerdo a lo reportado por Ruíz-Herrera *et al.* (1995). Se prepararon pre-inóculos de *U. maydis* en 5 ml de medio YEPSL a 28 °C, 200 rpm, por 24 h; para la inoculación de 15 ml de medio YEPSL, siguiendo las mismas condiciones de incubación, por 18 h. Las células se colectaron por centrifugación a 3500 rpm por 15 min, se lavaron dos veces con agua desionizada estéril, y se resuspendieron en el volumen inicial. La suspensión de células se incubó a 28 °C por 2 h a 150 rpm y se lavó nuevamente por centrifugación. Las células se resuspendieron con agua desionizada estéril a 1/10 parte del volumen inicial, y se determinó la concentración de la suspensión por conteo con cámara de Neubauer. Esta suspensión se mantuvo a 4 °C por al menos 15 min (máximo 48 h) y se empleó para la inoculación de MM a pH 7 y a pH 3 mantenidos a 37 °C (choque térmico), a una concentración final de 5×10^5 células/ml. Los cultivos se incubaron a 28 °C, 200 rpm, por 12 h, y se inspeccionaron microscópicamente (Leica DM750, Leica ICC50 HD) (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).

6.3.6 Ensayos de resistencia al estrés osmótico y al Rojo Congo

De forma similar a los ensayos de crecimiento relativo en agar, se centrifugaron y lavaron cultivos de *U. maydis* obtenidos en YEPSL, 28 °C, 24 h de incubación; y se estandarizaron a una concentración de 1×10^7 células/ml, con $OD_{600} = 0.5$ (DU 650 Spectrophotometer, Beckman Coulter, USA). Los inóculos se diluyeron serialmente, en base 10, con agua desionizada estéril. Una alícuota de 10 µL de cada dilución fue goteada en MC, MC+KCl 1 M, MC+NaCl 1M, MM, MM+KCl 1 M y MM+NaCl 1 M, MC+Rojo Congo 150 µg/ml. Los cultivos se incubaron a 28 °C por 48-72 h y se comparó el crecimiento entre las cepas sembradas, a menor crecimiento, mayor sensibilidad (González-Prieto, 2003; Ram y Klis, 2006; Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997; Xue-Franzen *et al.*, 2010).

6.3.7 Ensayos de sensibilidad al estrés oxidativo por difusión de H₂O₂ en disco

Se plaquearon 150 µl de una suspensión celular de *U. maydis* a $OD_{600} = 0.8$ (DU 650 Spectrophotometer, Beckman Coulter, USA), sobre la superficie de MC y MM. Un disco de papel filtro estéril de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, humedecido con 2 µl de H₂O₂ al 30%, se colocó en medio de cada placa. El diámetro de los halos de inhibición se midió luego de 72 h de incubación a 28 °C (Molina y Kahmann, 2007).

6.4 OBJETIVO 4

Determinar la participación del gen caracterizado en la virulencia de *U. maydis*.

6.4.1 Ensayos de virulencia en maíz

Los ensayos de virulencia se realizaron en invernadero, de acuerdo a lo reportado por Kamper (2006) (Kamper *et al.*, 2006). Para cada cepa se partió de pre-inóculos en 5 ml de medio YEPSL, 28 °C, 150 rpm, 24 h de incubación, a partir de los cuales se preparó un volumen mayor de cultivo en YEPSL a 28 °C, 150 rpm, por 18 h. Se realizaron dos lavados

de las células por centrifugación, empleando agua desionizada estéril, y se estandarizaron inóculos de las cepas a evaluar a $OD_{600} = 3.0$. Se prepararon las mezclas correspondientes y se infectaron plántulas de maíz de la variedad Golden Bantam (Jungseed, WI, USA), en estado de la tercera hoja (12 días posteriores a la siembra). Para esto se inyectaron 100 μ l de suspensión celular en el tallo de las plantas con una jeringa de insulina estéril, a una altura aproximada de 1 cm por encima del nivel del suelo. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron a los 15 días post- infección. Las categorías para la medición de los síntomas empleadas fueron: sin síntomas (0), clorosis y/o antocianinas (1), tumores pequeños (< 1 cm) (2), tumores grandes (> 1 cm) (3) y planta muerta (4). Se calculó el índice de la enfermedad (Gonzalez-Prieto *et al.*, 2014; Martinez-Espinoza *et al.*, 1997; Redkar y Doehleemann, 2016; Redkar *et al.*, 2015; Schilling *et al.*, 2014). El análisis estadístico de los resultados se realizó en el programa SPSS 23.0.

7 RESULTADOS

7.1 OBJETIVO 1

Revisar el estado del arte de la epigenética en organismos eucariotas.

Villota-Salazar, N.A., Mendoza-Mendoza, A., González-Prieto, J.M., 2016. Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science* 9, 347-370.

En esta revisión se realiza una compilación de los eventos más importantes en la historia de la epigenética y se analizan las implicaciones de estos descubrimientos en la comprensión del funcionamiento de los organismos eucariotas. Se describen los principales mecanismos de regulación epigenética y su forma de actuar como parte del código epigenético. Finalmente, se aborda el rol de la epigenética en la aparición de la enfermedad, la herencia de características epigenéticas, el surgimiento de la epidemiología epigenética y se aborda la posibilidad de que las variaciones surgidas por eventos epigenéticos en las poblaciones, sean tenidos en cuenta en los modelos evolutivos conocidos.

En la actualidad, muchos fenómenos biológicos son investigados desde la perspectiva epigenética, sin embargo, es un área que por mucho tiempo permaneció desconocida o poco comprendida. Recientemente se ha establecido que en los organismos eucariotas la ocurrencia de fenómenos epigenéticos está relacionada con la organización del DNA en el núcleo. Dicha organización puede cambiar frente a estímulos ambientales, por lo cual la epigenética es el punto de conexión entre el genoma y el ambiente. Lo anterior tiene claras repercusiones en el surgimiento del fenotipo, y por lo tanto en los diversos procesos de diferenciación celular y desarrollo de los organismos (Ver Apéndice).

7.2 OBJETIVO 2

Caracterizar un gen correspondiente a una proteína involucrada en la remodelación de la cromatina en *U. maydis*.

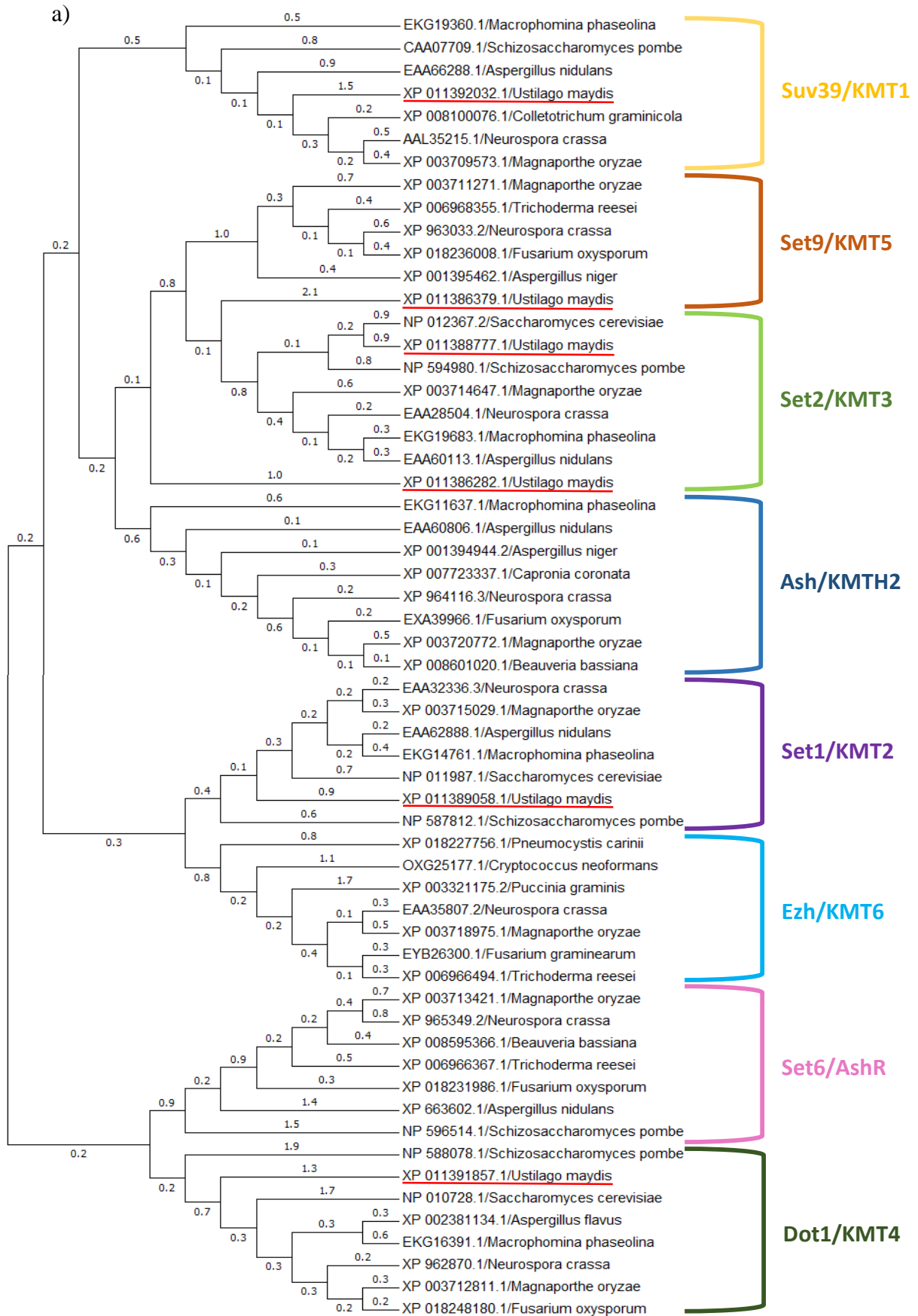
7.2.1 Identificación de los genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas y el regulador transcripcional Sin3 en *U. maydis*.

La búsqueda basada en reportes previos, BLAST y filogenia, permitió la identificación de 10 genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas y un gen que codifica para el regulador transcripcional Sin3, en el genoma de *U. maydis* (Cuadro 3, Figura 7 y Figura 8). De las 10 proteínas metiltransferasas de histonas encontradas, 6 corresponden a metiltransferasas de lisina y 4 a metiltransferasas de arginina. Estas proteínas fueron denominadas como XP_011392032, Suv39; XP_011389058, Set1; XP_011388777, Set2a; XP_011386282, Set2b; XP_011386379/Set9; XP_011391857, Dot1; XP_011392245, Prmt1; XP_011391078, Prmt3; XP_011387335, Prmt4; XP_011387515, Prmt5. No se encontraron homólogos para las proteínas Ash/KMT2H, Ezh/KMT6 y Set6/AshR.

Como puede observarse en la Figura 7, a; Ash está presente en hongos como *N. crassa* y *M. oryzae*. Ésta proteína participa de la metilación de H3K36me2 en *Drosophila melanogaster* y los mamíferos. Por su parte, Ezh se encuentra en hongos como *N. crassa*, *M. oryzae* y *C. neoformans*. Ezh está involucrada principalmente en la metilación de H3K27. Finalmente, Set6 está en *N. crassa*, *M. oryzae* y *S. pombe*, sin embargo, no existe información acerca de la marca epigenética asociada. La filogenia muestra además la formación de dos clados principales. El primer clado incluye la agrupación de las proteínas Set9, Set2, Ash y Suv39, y de las proteínas Set1 y Ezh, en dos clados diferentes. El segundo clado principal abarca a las proteínas Set6 y Dot1. Lo anterior es muy elocuente acerca de las relaciones que existen entre estas secuencias. Sorprende que proteínas con dominio SET compartan clado con aquellas que no poseen dicho dominio, sin embargo, esto podría indicar un origen común.

Cuadro 3. Homología de las proteínas identificadas con respecto a las de otros organismos.

| Proteína | Accesión en <i>Ustilago maydis</i> | | Organismos de referencia | | | | | |
|--------------------|------------------------------------|----------------|--------------------------|---------|--------------------|----------------|-----------|---------|
| | Nombre | Accesión | Identidad | E value | Organismo | Accesión | Identidad | E value |
| Suv39/KMT1 | <i>N. crassa</i> | AAL35215.1 | 32% | 2 E-15 | <i>M. oryzae</i> | XP_003709573 | 31% | 2 E-11 |
| Set1/KMT2 | <i>S. pombe</i> | NP_587812.1 | 30% | 6 E-72 | <i>M. oryzae</i> | XP_003715029 | 47% | 1 E-58 |
| Set2/KMT3 | <i>S. pombe</i> | NP_594980.1 | 46% | 1 E-109 | <i>M. oryzae</i> | XP_003714647 | 35% | 1 E-90 |
| Set2/KMT3 | <i>S. pombe</i> | NP_594980.1 | 32% | 1 E-30 | <i>M. oryzae</i> | XP_003720772.1 | 30% | 7 E-45 |
| Set9/KMT5 | <i>N. crassa</i> | XP_963033.2 | 48% | 7 E-17 | <i>M. oryzae</i> | XP_003711271.1 | 45% | 4 E-17 |
| Dot1/KMT4 | <i>S. cerevisiae</i> | NP_010728.1 | 32% | 3 E-35 | <i>M. oryzae</i> | XP_003712811 | 41% | 8 E-53 |
| Prmt1 | <i>S. cerevisiae</i> | NP_009590.1 | 59% | 3 E-133 | <i>A. nidulans</i> | AAQ02691.1 | 67% | 2 E-155 |
| Prmt3 | <i>S. pombe</i> | CAA17825.2 | 29% | 2 Ee-65 | <i>A. nidulans</i> | AAR27791.1 | 34% | 1 E-94 |
| Prmt4/CARM1 | <i>C. neoformans</i> | XP_012052352.1 | 38% | 1 E-80 | <i>H. sapiens</i> | XP_011525940.1 | 38% | 2 E-59 |
| Prmt5 | <i>S. cerevisiae</i> | NP_009691.1 | 31% | 1 E-73 | <i>A. nidulans</i> | AAR27792.1 | 40% | 4 E-111 |
| Sim3 | <i>S. cerevisiae</i> | NP_014639.1 | 46% | 4 E-117 | <i>S. pombe</i> | NP_596012.2 | 39% | 2 E-92 |



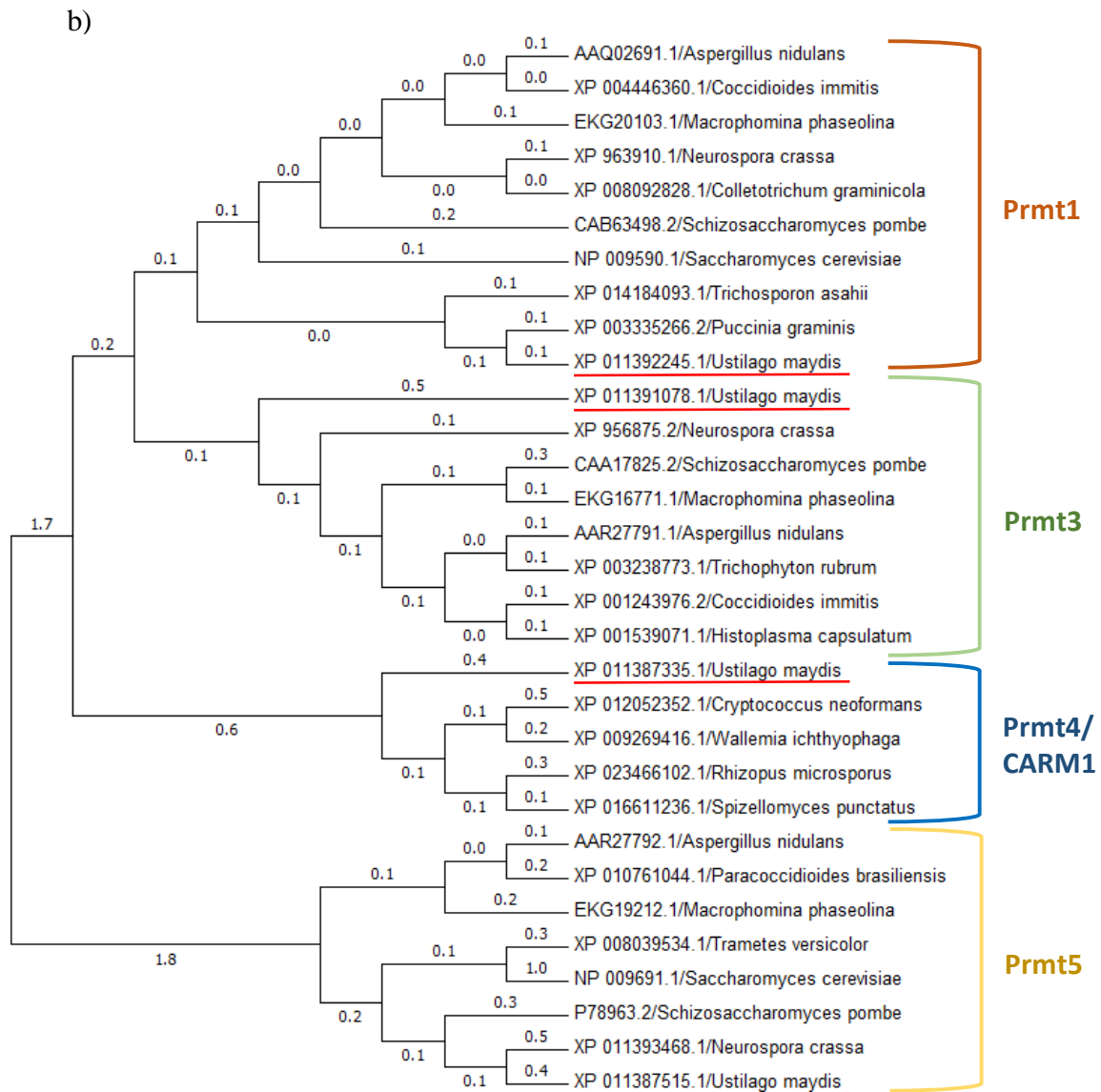


Figura 7. Reconstrucción filogenética de las proteínas metiltransferasas de histonas en algunas especies de hongos. a) Árbol filogenético de metiltransferasas de lisina (HKMTs). Método de máxima verosimilitud, modelo WAG+G, bootstrap:1000. b) Árbol filogenético de metiltransferasas de arginina (PRMTs). Método de máxima verosimilitud, modelo LG+G, bootstrap:1000. Se presenta el número de sustituciones por sitio.

En el árbol filogenético de PRMTs (Figura 7, b), también se aprecia la formación de 2 clados, el primero contiene a las proteínas Prmt1, Prmt3 y Prmt4, el segundo a la proteína Prmt5. *U. maydis* tiene un representante de cada una de estas proteínas. Por su parte, la filogenia de Sin3 evidencia que esta proteína de *U. maydis* es cercana a sus equivalentes en *C. neoformans*, *Pneumocystis carinii* (basidiomicetos) y *S. pombe* (ascomiceto). En

todos los casos, la reconstrucción filogenética permitió la confirmación de la identidad de las secuencias de trabajo.

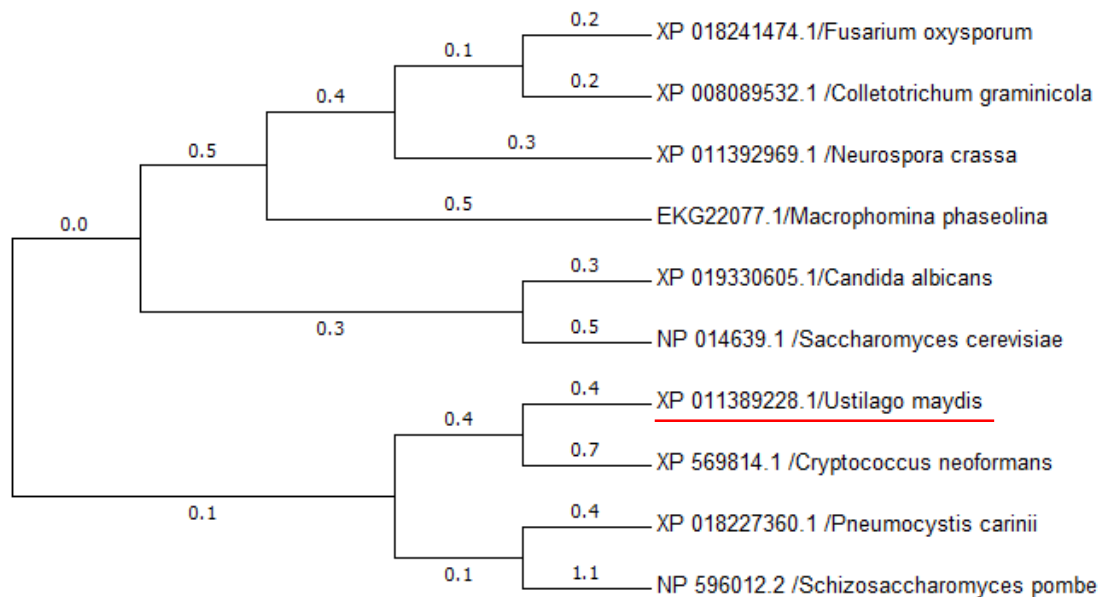


Figura 8. Reconstrucción filogenética de las proteínas Sin3 en algunas especies de hongos. Método de máxima verosimilitud, modelo LG+G, bootstrap:1000. Se muestra el número de sustituciones por sitio.

Como se puede observar en el Cuadro 4. Los genes identificados se encuentran distribuidos a lo largo de varias cromosomas, en su mayoría se localizan en la cadena con dirección negativa del DNA (con excepción de *SET2B* y *DOT1*) y no poseen intrones (con excepción de *PRMT5* y *SIN3*).

7.2.2 Elaboración de los casetes de interrupción para la mutación de los genes de estudio

Siguiendo la metodología señalada en el apartado 6.2.9 (Figura 9), se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la amplificación de los bordes de algunos de los genes identificados, así como los oligonucleótidos anidados para la amplificación completa de los mismos y de los casetes de interrupción. En los Cuadros 5 y 6 se encuentra el listado de iniciadores elaborados.

Cuadro 4. Metiltransferasas de histonas y regulador transcripcional Sin3 en *U. maydis*.

| Proteína | Accesion NCBI | Tamaño (aa) | Identificación MUMDB | Posición del gen | Cadena | Tamaño ORF (pb) | Intrones |
|--------------------|---------------|-------------|----------------------|-------------------------------|--------|-----------------|----------|
| Suv39/KMT1 | XP_011392032 | 509 | UMAG_05327 | Um_chr19:218,126..219,655 | Neg | 1530 | No |
| Set1/KMT2 | XP_011389058 | 1468 | UMAG_02677 | Um_chr06:550,273..554,679 | Neg | 4407 | No |
| Set2a/KMT3 | XP_011388777 | 972 | UMAG_02500 | Um_chr05:1,373,419..1,376,337 | Neg | 2919 | No |
| Set2b/KMT3 | XP_011386282 | 1367 | UMAG_00400 | Um_chr01:1,122,934..1,127,037 | Pos | 4104 | No |
| Set9/KMT5 | XP_011386379 | 1353 | UMAG_00543 | Um_chr01:1,580,229..1,584,290 | Neg | 4062 | No |
| Dot1/KMT4 | XP_011391857 | 798 | UMAG_05545 | Um_chr18:328,759..331,155 | Pos | 2397 | No |
| Prmt1 | XP_011392245 | 346 | UMAG_05900 | Um_chr20:304,783..305,823 | Neg | 1041 | No |
| Prmt3 | XP_011391078 | 618 | UMAG_04375 | Um_chr14:246,268..248,124 | Neg | 1857 | No |
| Prmt4/CARM1 | XP_011387335 | 443 | UMAG_10569 | Um_chr02:144,127..145,458 | Neg | 1332 | No |
| Prmt5 | XP_011387515 | 765 | UMAG_15057 | Um_chr02:663,347..665,746 | Neg | 2400 | Sí |
| Sin3 | XP_011389228 | 1461 | UMAG_11717 | Um_chr06:657,892..662,473 | Neg | 4582 | Sí |

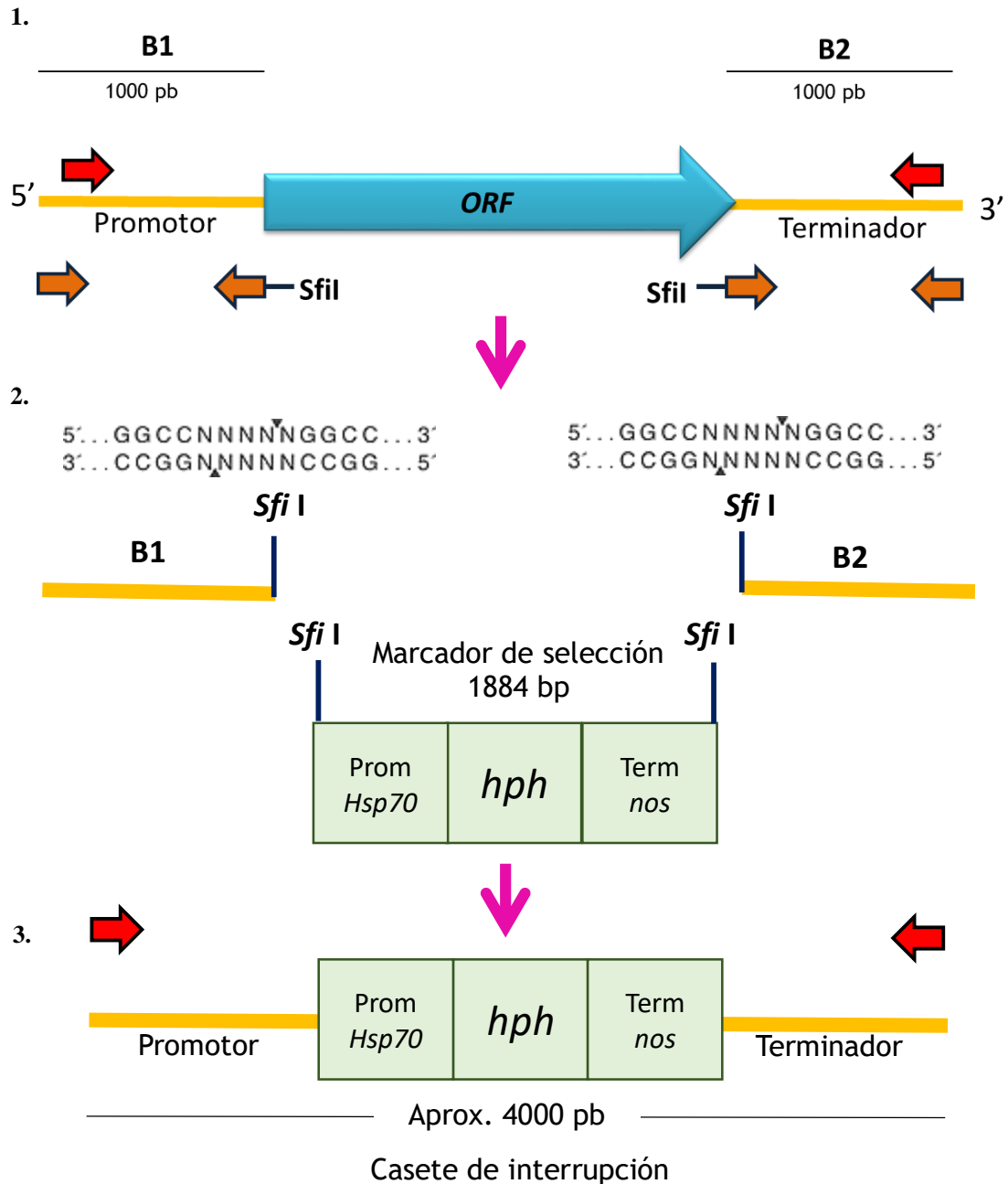


Figura 9. Esquema de la elaboración de los casetes de interrupción para la transformación genética de *U. maydis*. 1. Identificación de los genes de trabajo y diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los bordes de los genes, incluyendo sitios de restricción *Sfi I* complementarios a los que flanquean el casete con el marcador de selección de resistencia a la higromicina en el plásmido pBS-hhn. Diseño de oligonucleótidos anidados para la amplificación del gen completo. 2. Amplificación por PCR de los bordes de los genes, clonación en pCR Blunt II TOPO y digestión con *Sfi I*. Obtención del casete de *hph* por digestión con *Sfi I*. 3. Ligación de los tres fragmentos. Amplificación del casete de interrupción empleando los iniciadores anidados previamente diseñados.

Cuadro 5. Iniciadores diseñados para la amplificación de los bordes de los genes de estudio.

| Gen | Borde | Identificación del iniciador | Secuencia 5'- 3' |
|--------------|-------|------------------------------|--|
| <i>SUV39</i> | 1 | SUV39SP | TCTACCCAGTAGGCAGGCAAGC |
| | | SUV39RP | ACC GGCCATCTAGGCC GAACCAGCTATCCTGACC |
| | 2 | SUV39ST | TCG GGCCTGAGTGGCC ACATCTCCTAATCCAACC |
| | | SUV39RT | ACGGTGGAGAGGTGGTGCAAG |
| <i>SET1</i> | 1 | SET1SP | TTCGCTTCTGGACCGAGTGC |
| | | SET1RP | TTC GGCCATCTAGGCC GATTGCTGCGACAGAATG |
| | 2 | SET1ST | GTAG GGCCTGAGTGGCC GGTCAGGCAGAAAACGTG |
| | | SET1RT | CACGAGCACTGTTCGAATTGG |
| <i>SET2A</i> | 1 | SET2ASP | GTGAATCGTGAATCGGGCGTC |
| | | SET2ARP | ATG GGCCATCTAGGCC TTGGAGCGATGAATGGGA |
| | 2 | SET2AST | GTT GGCCTGAGTGGCC CAAAAACAAAACAAAAG |
| | | SET2ART | GCATGACTTTGACAAGAGCGAG |
| <i>SET2B</i> | 1 | SET2BSP | CACTGATTTGGGTTACAATCG |
| | | SET2BRP | TGT GGCCATCTAGGCC CGATCGGAGAGTAAGCTG |
| | 2 | SET2BST | CAC GGCCTGAGTGGCC AGCATGCCATTTTTTGGGA |
| | | SET2BRT | CTCTCAGCCATGACTATAAGC |
| <i>DOT1</i> | 1 | DOT1SP | CGGTCCGGTGTGCAAGTTGTC |
| | | DOT1RP | ATG GGCCATCTAGGCC CGGGGCAGAATGACGGTG |
| | 2 | DOT1ST | ATC GGCCTGAGTGGCC AGGTGTGCGCTCCCACAC |
| | | DOT1RT | AAAGGTCTCGCGGTGAAATAC |
| <i>PRMT1</i> | 1 | PRMT1SP | GCTTGATTGTAGAGCGAGTTC |
| | | PRMT1RP | TCT GGCCATCTAGGCC TGCTGTCCAAGTGAAGAG |
| | 2 | PRMT1ST | ATT GGCCTGAGTGGCC TTTATTTCGTGATTGATAC |
| | | PRMT1RT | CTGGAGGATATTCTCAGAACG |
| <i>PRMT3</i> | 1 | PRMT3SP | AGAAACGTACCACTTCACTGT |
| | | PRMT3RP | TTT GGCCATCTAGGCC CGTTGCTACAGCTCGGTC |
| | 2 | PRMT3ST | ACG GGCCTGAGTGGCC AATGCAATCCAGATTTGC |
| | | PRMT3RT | AGTCGGTATTCAACTTTTGCG |
| <i>PRMT4</i> | 1 | PRMT4SP | GATCTCGTGTACGGCTTGTGC |
| | | PRMT4RP | GCT GGCCATCTAGGCC GTAATATCCAAAATACGC |
| | 2 | PRMT4ST | CAAG GGCCTGAGTGGCC GCACACAGGAAGGAACAT |
| | | PRMT4RT | GCGCGAAGGCACTCAGACTGA |
| <i>SIN3</i> | 1 | SIN3SP | CATCGAAACGGCTTTACCATC |
| | | SIN3RP | GAA GGCCATCTAGGCC CGTTGAAATTGATTGATG |
| | 2 | SIN3ST | TTC GGCCTGAGTGGCC TGCTTCGTTTCATGTACTG |
| | | SIN3RT | CTTAACCGTCTTGCCCAAGAAG |

En rojo se señala el sitio de restricción para *Sfi* I incluido en cada caso.

Cuadro 6. Iniciadores anidados diseñados para la amplificación de los genes de trabajo y de los casetes de interrupción.

| Gen | Identificación del iniciador | Secuencia 5' - 3' |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------|
| <i>SUV39</i> | AnidSUV39s | ACGACCGCGGGGTAGGGCAAC |
| | AnidSUV39r | TGATAAGGGAGCAGGCGGAAC |
| <i>SET1</i> | AnidSET1s | GACAGGTACGTCAGGTTTCAG |
| | AnidSET1r | TGGGTCAGGCGGAGGGTGGAG |
| <i>SET2A</i> | AnidSET2as | CTATTCTCCCGTAGCTCTTTG |
| | AnidSET2ar | TCTATGACGCCGACTTTTCGC |
| <i>SET2B</i> | AnidSET2bs | GTGAGTAATTCAGGAAGCGGG |
| | AnidSET2br | CGCTTTTGTGTCGTTGACTC |
| <i>DOT1</i> | AnidDOT1s | CGAAAACAAGTTACGTGTATC |
| | AnidDOT1r | GCAGGGTTGTTGGCAGGCTGG |
| <i>PRMT1</i> | AnidPRMT1s | GCGAGTTCATTGTCAGGCACG |
| | AnidPRMT1r | ACTACAAGAGCAGCAGCAATG |
| <i>PRMT3</i> | AnidPRMT3s | ACTGTAAAAGCGGTCAACGAG |
| | AnidPRMT3r | CGATTGCCACGCTTGAACATCAT |
| <i>PRMT4</i> | AnidPRMT4s | TGTGCGAGCAGGAGCTTGTCG |
| | AnidPRMT4r | TGAGACTAAATTTGGATGGAG |
| <i>SIN3</i> | AnidSIN3s | ATCGACGTGCTTCCTCATCCC |
| | AnidSIN3r | AAGGAGGGTCGTAAGTATCAC |

A continuación, se muestran los resultados de la amplificación por PCR de los bordes de los genes *SUV39*, *SET1*, *SET2A*, *SET2B*, *DOT1*, *PRMT1*, *PRMT3*, *PRMT4* y *SIN3* (Figura 10). Estos promotores y terminadores se clonaron en el plásmido pCR Blunt II TOPO (3519 pb, Invitrogen) (Apéndice), y se introdujeron en células de *E. coli DH5α* para su propagación y extracción de DNA plasmídico. Luego del escrutinio de las clonas por digestión enzimática, la dirección de la inserción de los fragmentos se corroboró por secuenciación y digestión (ejemplos en las Figuras 11 y 12). Los plásmidos obtenidos se denominaron como PZ_PromSUV39, PZ_TermSUV39, PZ_PromSET1, PZ_TermSET1, PZ_PromPRMT1, PZ_TermPRMT1, PZ_PromSIN3, PZ_TermSIN3, PZ_PromSET2A, PZ_TermSET2A, PZ_PromSET2B, PZ_TermSET2B, PZ_PromPRMT3, PZ_TermPRMT3, PZ_PromDOT1, PZ_TermDOT1, PZ_PromPRMT4 y PZ_TermPRMT4. Una vez establecido el sentido del borde clonado, se liberaron los promotores y terminadores empleando la combinación de enzimas especificada en el

Cuadro 7. Los fragmentos de aproximadamente 1000 pb se purificaron a partir del gel (Figuras 13) y se determinó su concentración. El borde 2 de *SET2B* no pudo ser obtenido al cortar el plásmido PZ_TermSET2B con *Sfi* I. Es probable que se haya perdido el sitio *Sfi* I correspondiente.

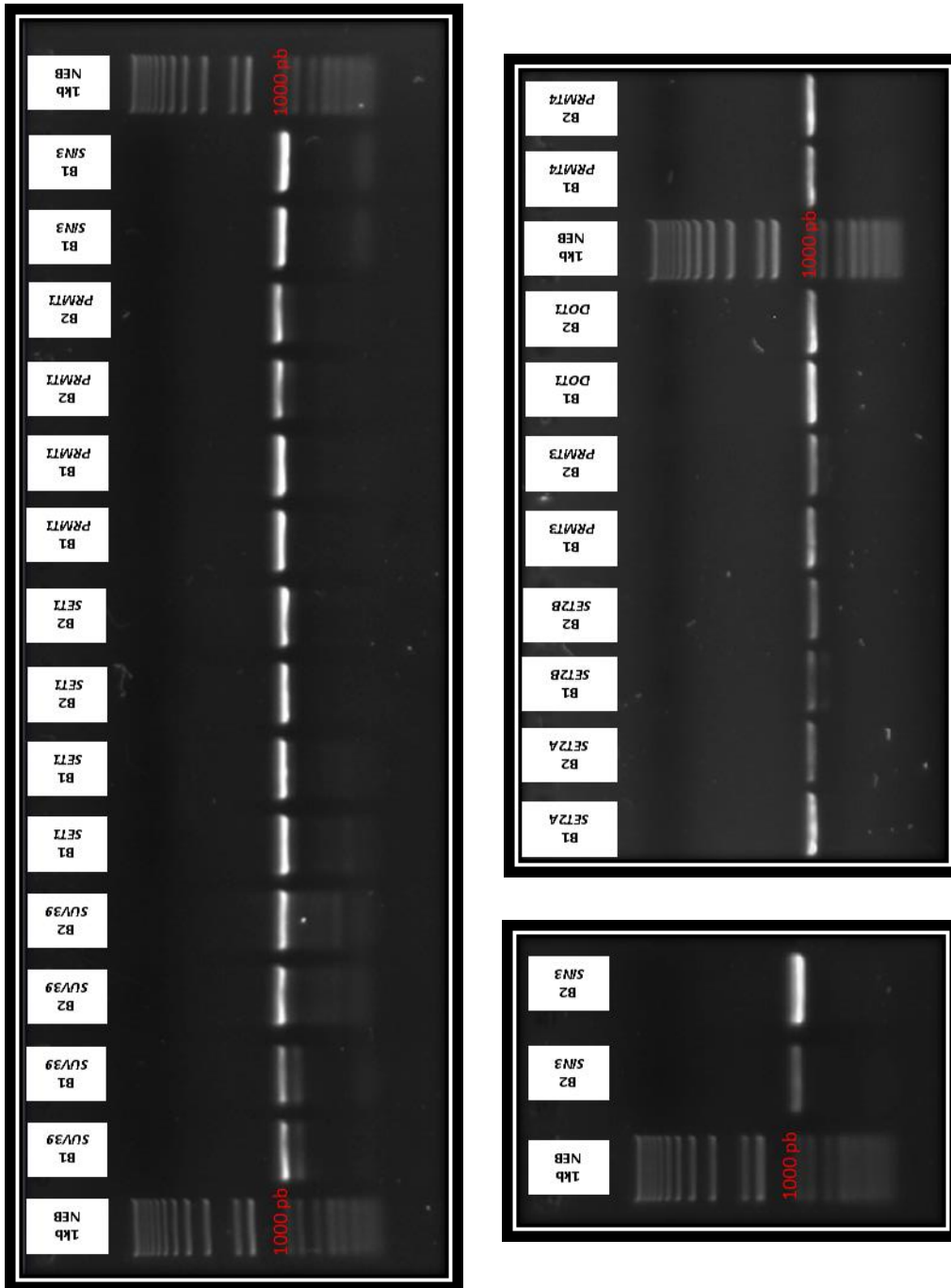
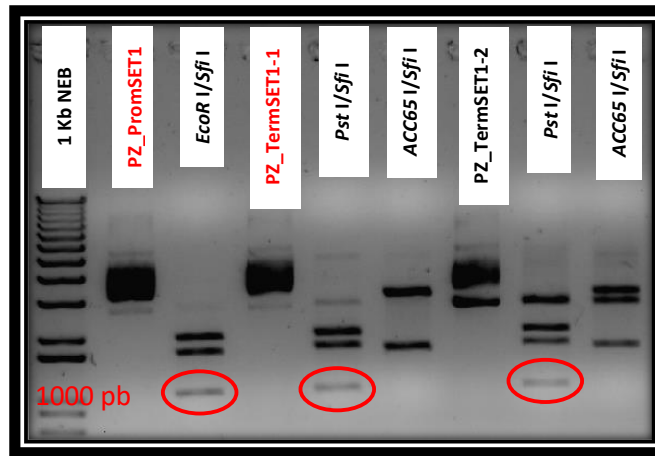


Figura 10. Amplificación por PCR de los promotores y terminadores de los genes de estudio. B1: promotor, B2: terminador.

a)



b)

```

1 ccccaaggga taggactcac tataggggcga attgggccc ttagatgcac gctcgcagcgg cgcgcagtg gatggatgc tgcagaattc gccctttccg ctttctggac cgaagtccga caggtcagtc
  ggggtttccc atcctgagtg atatcccgc taaaccggga gatctacgta cgaagctcgc gggcggtcaca ctacctatag acgtcttaag cgggaaaaagc gaaagaccctg gctcacagcgt gctccatgca
131 aggtttcagt ggcaagaagt cgtttgatag gagatcgga tggagcctt ttggggcggt tggatgagta tagatgtatt gaggcagttt gaaacgtgca acgtgaatcg tgaatcgctg agtgaatcgt tcacttagca
  tccaaagtc cgtttcttca gcaaacatc ctctcagcct agctccgaaa aaccgcgcca acctactcat atctacataa ctccgtcaaa ctttgcacct tgcacttagc acttagcagc tcacttagca
261 gaatcacgaa tgtaaagcgt gaagettgaa acacgcaag gccatgagcg aatcacgaa tcacctgca ggagctgta atggacgct tggctcgtct gccagcttaa cattgaagc ccttcgccgt
  cttagtctt acatttcgca cttcgaact ttgcgctcc cgtactcgc tttagtctt agtgggacgt cctcagcact tacctcgga accaagcaga cggtcagatt gtaactctg ggaagcggca
391 gccgtgactc acgactcact ggtgactgag ttgtgaaggg cactgtttg ggataacta acattttct ttccctctaa atatccaaca cggctcagcg cgttgaatag tctgagtaat cttgtaatca
  cggcactgag tgcctgagta ccaactgact aacacttccc gtgacaaca cctattgaat tgtgaaaaga aaggcagatt tatagttgt gccgagctgc gcaacttacc agactcata gacacttagt
521 gagtcggcag tctccgagtg ggaagtgca cagcaaacca tactcacgac tgtggtagaa atcgacactt aaccgcctct acagggctac tctctctctg tctctctctg aaaccaaccg tgaactggga
  ctcagcctc agaggtcacc cgttaccgt gtgctttgt atgagtgtg acaccatct tagctgtgaa ttggcggaga tgcccctag agagagaaa agagagacac tttggttggc actgaactct
651 gagggtcccg agtcgctgtg cggggctgc caaaaagct tccggcatc ttttcatctg agaatacaga atgttgagct ttgaaacca tcaatcgta ttcacgattg gtatttgoga tcatcatccg
  cccccaggc tcagcgcaca cgcgccgacg gttttcga aagccgtaga aaaagtagac tcttagtct tacaactcga aagctttgt agtaagcact aagtgtaac cataaacgct agttagtagc
781 ggtagccagc gctctgctcg ctcactcctc tgcactcatt cgtctctt cagctccgc tttcccggca cagacaaga acactacaag cggagcagcc aaaagcttg agatttccag tctgtctgat
  gctctgctcg cgagacgagc gactgagcga agctgagtaa cgtcagcaga gtcagagcaga gtcgagcggc aaagggccgt cctctgtctg tgtgatctc gcctctcgg ttttcgaa caactaacg
  agcagcagca
911 cgaattgtct ggagctgtt gccctcgcga tttgcctct cctatcacac acagatcagc tgtccacc aatgatcgg catcagctgt aaaagtaca cagtgatcaa ctcactacgc cttgtggaa
  gtaaacaga cctccgaca cggagagcgt aaacggcaga ggatagtggt tgtctagct acaggtgtg ttaactcgc gtatgcaga tttctatag tcaactagt gactgagc gaaacactt
1041 cagctgagc tctcgcagc taattccaga gtccattctg tgcagcaat Sfi cggcctagat ggccgaaaag gcactccaga caccttccc cgtacatgat ccgactcga cacagaccctg tcagac
  atcactacc agagcgtctg attaaggtct caggtaaagc agcgtctgta gcggatata cggcctttc cgtaggtcgt gtggaacgc gcactgacta ggtcagcat gttctggac agtctg

```

c)

```

1 ggaatagaat cagactcact atagggcgaa ttgggccc ttagatgcac ctcgagcgc cgcagtggt atggatctc gcagaattcg ccttcacca cgaactgtc tcgaaactgg cgtgggtcag
  cttattctta gctcagtgta tatcccgc taaaccggga atctacgta cagctcgcg cgggtcacc taactataga cgtcttaagc gggaaagtgt gctcgtgaca agcttgacc gccaccagtc
131 cgggggggtg gagaggcaag tggcgggttg gacatgccag agattgtgtg gaaagcgtac attgatttcg aatttgaaga gcgcgagtg gagaagtggt atgcattgta cgaaaggtta ttggcgaaga
  cgcctcccac ctctccgttc accgcccac ctgtacggtc tctaaccac ctttcgatg taactaaagc cgcgctcacc ctctccacc tacgtaacat gcttccaat aaccgctct
261 cgggacacgt caaagtgttg atctcgtatg ccttctccaa gatcaaccga gctacggcga tggaggaaga tgaagacgaa gaggacgat accatgatca cgtacagat atggcggcaa ccccatcgcg
  cgcctgtgca gtttccacc tagagcatac ggaacaggtt ctagtgtgct cgtagccgct agctcctct actctgctt ctctgtac tggactagt gctactgta taccgctgt ggggtagcgc
391 agagttgacc gaagaggaa aagcgttgcg tcaaacgct cgtcagcac tgcactctc cgcgcgaa atctccagc gtgcctaca caactcaaa tctcgtccc taaagacga accggttgc
  tctcaactgg ctctctctc ttcgcaacc agttgtcga gcgagctg agctagaag gcgcgctct tagaaggtc cacggatgt gtagagtt agagcaggg attttctgt tgcaccaagg
521 ttctagaaat cttggaact gttcgaaca caacaggtt cagcagcag actatctcga gttagggcga aatcccgcg ggtcgtcaa aaacgcagac aggtggaaga cagtgggat ggaagcagtg
  aacgatctta gaactcttag caagcttgtt gttgtgcca gtctctctg tgatagact caatcccgt taaagggcgc ccagcagttt tttgctctg tccactctt gtaacgcta cctgctacc
651 aggagtaact cgatctcact tccccgacg accaagacga gggcaaggt gtttcaagc tgttacagat ggctcagct tggagagctg cccaagcgc aaaggagcag cagcagcagc agcagcaatc
  tctcatgat gctagagtag aagggctgc tggttctgt cccgttcca cgaagctgc acaatgtcta ccgagtgca acctctgac ggttccgcg tttctctgct gctcgtctg tctcgttag
781 atcagtgct gagactggt caagtcaag tgcagtgta ggtgcaact gggatgatg cgggatgag gagagcattg gcattgctat agacgacgat caagagcag atgccagcgg agaagaagca
  tagctcaga cctcagacc gttcagctt acgtccagct ccacgttgac cctactaca cgcctactc ctctcgtaac cgtaacgata tctgctgta gttctcgtc tacggtcgc tctctctgt
911 tgaagcgcac acttctgac ttcgactccg agactcatt gcaacactca cagactagca cttgtgactc tctgatatc cagaactaca cgaaatgcaa aagttcatcc aaggcaaaaa aaaagacatg
  actcccgcta tgaacgactg aagctgagcc cctgagtaaa cgttctgagt gctctgctg gaacactgag agactataga gcttctgct gcgttacgtt tcaagtagg ttcctgttt tttctctgac
1041 atcattccaa gttgactgc cagctttct gctgaccgg ccaactcagg ctacaagggc gaattccagc acactggcgg cgttactag tggatccgag gtcggtacca agcttgatgc atagctttaa
  tagtaaggt caactgacc gtgcaaaaga cggactggcc ggtgagctcg gatgtccc cttaaaggtc tgtgacgccc ggcaatgac acctagctc cagccatggt tcgaaactag tatgaaact
1171 gtattctata gttcaccata aatagcttgg cgttaattcaa ggtaccatc
  cataagat cactggtt ttatcgaacc gcataagtt ccatggtag

```

Figura 11. Resultados del escrutinio de clonas y la secuenciación para la identificación de los plásmidos PZ_PromSET1 y PZ_TermSET1. a) Liberación de las secuencias promotoras y terminadoras clonadas, a partir del DNA plasmídico de algunas de las clonas obtenidas. Primero se muestra el plásmido sin cortar y luego el resultado de su digestión. En un círculo rojo se señala el fragmento correspondiente al promotor o terminador liberado. Las bandas restantes corresponden a restos del plásmido. En rojo se indica el plásmido que se seleccionó para secuenciación. b) Secuencia consenso obtenida luego de la secuenciación de PZ_PromSET1. c) Secuencia consenso obtenida luego de la secuenciación de PZ_TermSET1-1. Se muestran los sitios de restricción de importancia.

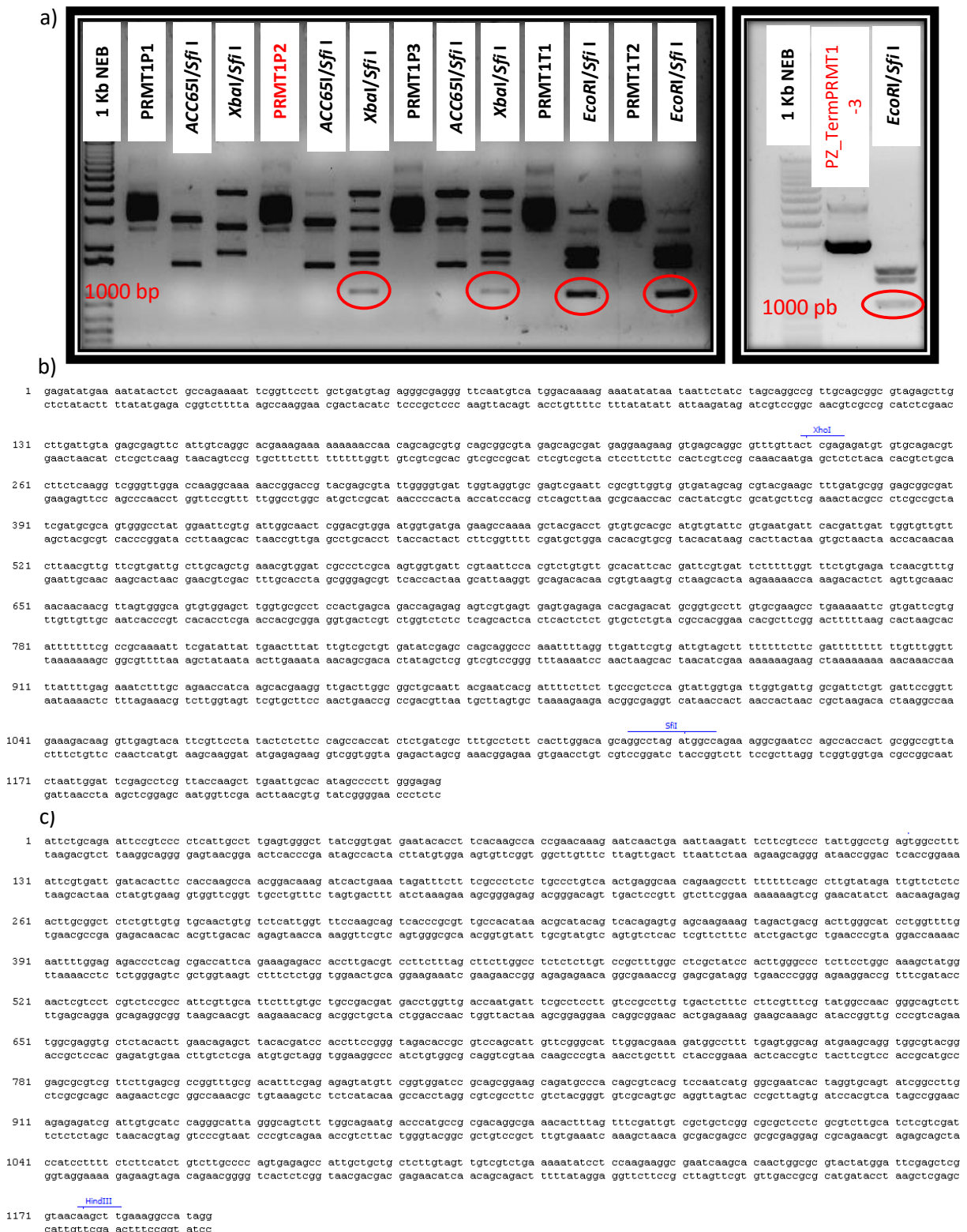
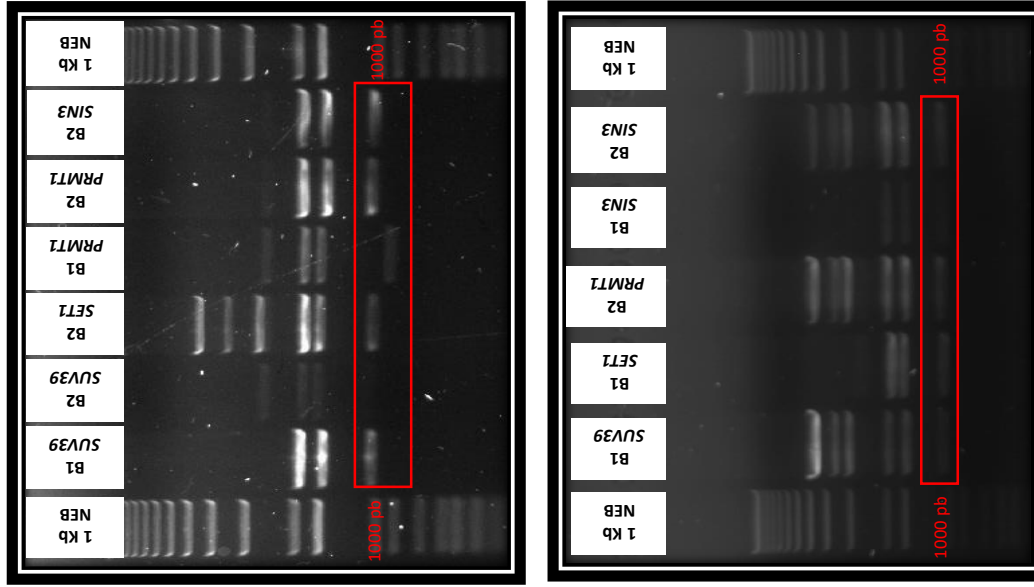


Figura 12. Resultados del escrutinio de clonas y la secuenciación para la identificación de los plásmidos PZ_PromPRMT1 y PZ_TermPRMT1. a) Liberación de las secuencias promotoras y terminadoras clonadas, a partir del DNA plasmídico de algunas de las clonas obtenidas. Primero se muestra el plásmido sin cortar y luego el resultado de su digestión. En un círculo rojo se señala el fragmento correspondiente al promotor o terminador liberado. Las bandas restantes corresponden a restos del plásmido. En rojo se indica el plásmido que se seleccionó para secuenciación. b) Secuencia consenso obtenida luego de la secuenciación de PZ_PromPRMT1-2. c) Secuencia consenso obtenida luego de la secuenciación de PZ_TermPRMT1-3. Se muestran los sitios de restricción de importancia.



Cuadro 7. Enzimas empleadas para la liberación de los bordes de los genes clonados en el plásmido pCR-Blunt II Topo.

| Gen | Borde | Plásmido | Enzimas utilizadas |
|-------|-------|--------------|-----------------------|
| SUV39 | 1 | PZ_PromSUV39 | <i>BamH</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermSUV39 | <i>Xba</i> I/Sfi I |
| SET1 | 1 | PZ_PromSET1 | <i>Xho</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermSET1 | <i>Xba</i> I/Sfi I |
| PRMT1 | 1 | PZ_PromPRMT1 | <i>Xho</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermPRMT1 | <i>Hind</i> III/Sfi I |
| SIN3 | 1 | PZ_PromSIN3 | <i>ACC51</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermSIN3 | <i>BamH</i> I/Sfi I |
| SET2A | 1 | PZ_PromSET2A | <i>BamH</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermSET2A | <i>Xba</i> I/Sfi I |
| SET2B | 1 | PZ_PromSET2B | <i>BamH</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermSET2B | <i>EcoR</i> V/Sfi I |
| PRMT3 | 1 | PZ_PromPRMT3 | <i>Pst</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermPRMT3 | <i>Hind</i> III/Sfi I |
| DOT1 | 1 | PZ_PromDOT1 | <i>Hind</i> III/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermDOT1 | <i>Pst</i> I/Sfi I |
| PRMT4 | 1 | PZ_PromPRMT4 | <i>Xba</i> I/Sfi I |
| | 2 | PZ_TermPRMT4 | <i>BamH</i> I/Sfi I |

Figura 13. Escisión de los bordes de los genes de estudio a partir del plásmido pCR-Blunt II Topo. Cada borde tiene un tamaño aproximado de 1000 pb. B1: promotor, B2: terminador.

A continuación, a partir de la digestión del plásmido pBS-hhn con la enzima *Sfi* I, se obtuvo el casete que contiene el gen de resistencia a la higromicina, *hph* (Figura 14). El fragmento correspondiente (1884 pb) se purificó a partir del gel y se estableció su concentración.

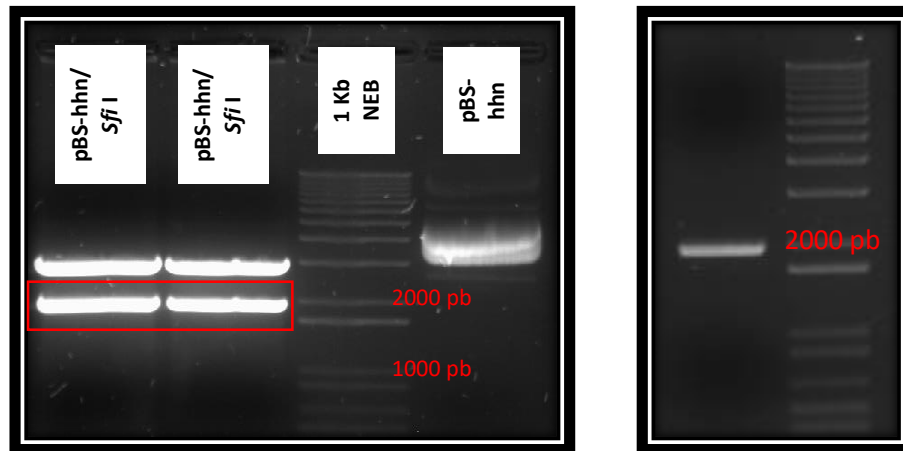


Figura 14. Liberación y purificación del casete de resistencia a la higromicina. A la izquierda se observa el producto de la digestión de pBS-hhn con *Sfi* I. En rojo se señala el fragmento de 1884 pb correspondiente al casete de higromicina. A la derecha se encuentra el resultado de su purificación.

Los bordes de cada gen y el casete de resistencia a la higromicina se ligaron, y a partir de los productos de ligación, se obtuvieron por PCR (Cuadro 6) las construcciones para la transformación genética del hongo (Figura 15).

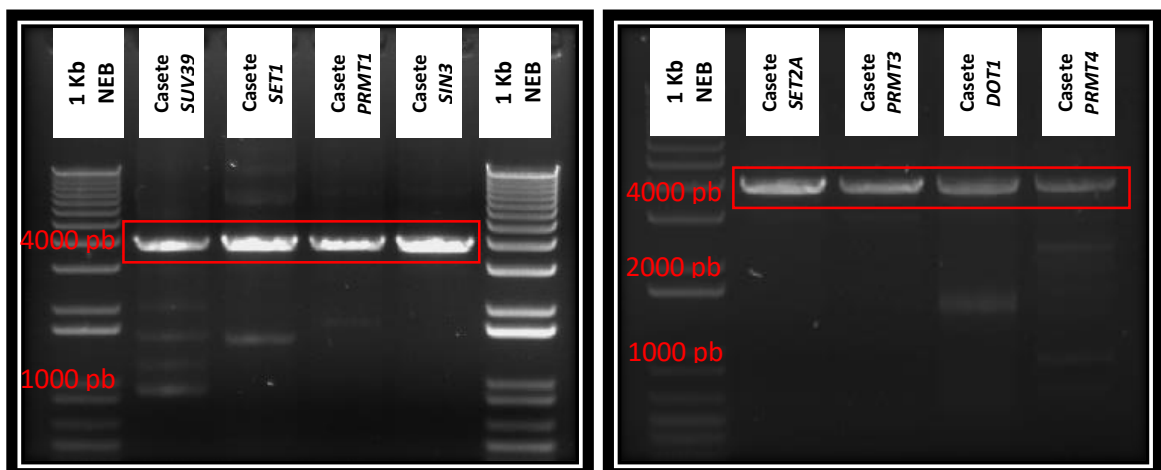


Figura 15. Resultados de las amplificaciones por PCR realizadas a partir de los productos de ligación, empleando los oligonucleótidos anidados. Se esperaban productos de un tamaño aproximado a las 4000 pb. Se presentan los casetes de interrupción para los genes *SUV39*, *SET1*, *PRMT1*, *SIN3*, *SET2A*, *PRMT3*, *DOT1* y *PRMT4*.

Las bandas correspondientes a las construcciones de los genes *SUV39*, *SET1*, *PRMT1* y *SIN3*, se purificaron y clonaron en los vectores pBlueScript II SK (+) (Apéndice) y pCR Blunt II TOPO, previa verificación por digestión con la enzima *Sfi* I (Figura 16).

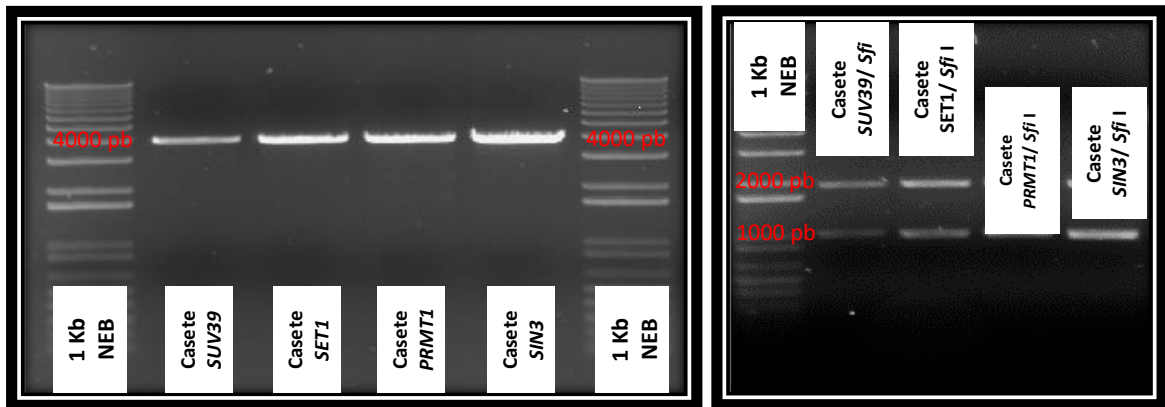


Figura 16. Purificación y verificación de las construcciones por digestión enzimática. A la izquierda se observan las construcciones para transformación luego de su purificación. A la derecha se encuentran los resultados de su digestión con la enzima *Sfi* I. En cada caso las bandas corresponden al casete de higromicina (1884 pb) y los bordes de los genes (1000 pb). Lo anterior se realizó previo a la ligación de cada fragmento a los vectores los vectores pBlueScript II-SK(+) y pCR-Blunt II Topo.

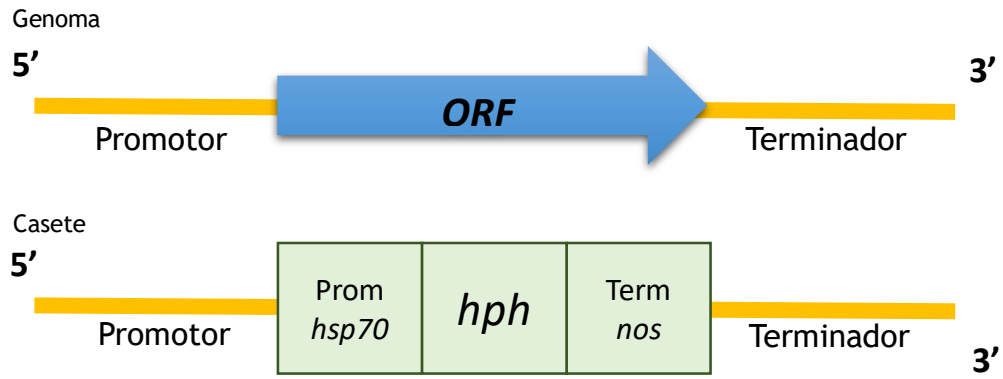
7.2.4 Interrupción de los genes *SUV39*, *SET1*, *PRMT1* y *SIN3*

Con el propósito de establecer si los genes *SUV39*, *SET1*, *PRMT1* y *SIN3* se requieren para la virulencia del *U. maydis*, se procedió a la remoción de los mismos, empleando los casetes de interrupción correspondientes. Estos casetes se introdujeron en protoplastos del hongo, para ser colocados en el lugar de los genes silvestres por el mecanismo de recombinación homóloga (Figura 17).

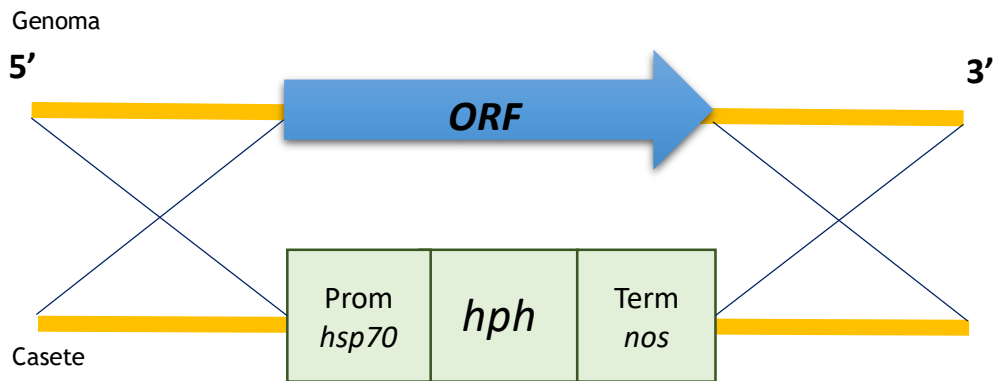
Luego de la obtención de clones en medio selectivo, se llevaron a cabo análisis por PCR y Southern blot para la identificación de transformantes. Se encontraron dos cepas mutantes para el gen *PRMT1*, denominadas AV3 (*alb1ΔPRMT1*) y AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), una cepa mutante para el gen *SET1*, denominada OW4 (*alb1ΔSET1*) y una cepa mutante para *SUV39*, denominada VS1 (*a2b2ΔSUV39*). Todas las clones escrutadas en búsqueda de mutantes para el gen *SIN3*, arrojaron doble señal. Incluso en la cepa silvestre no fue posible obtener una señal única del tamaño esperado. En los carriles correspondientes a

las transformantes para este gen, en todos los casos una de las dos bandas probablemente corresponde al casete insertado en el sitio esperado (Figura 22, 1263 pb). Empleando BLAST se estableció que la sonda posiblemente también podría unirse a una secuencia del gen que codifica para la proteína UMAG_11718 (Identidad: 100%, E-value: 2e-33, Cover: 5%, Gaps: 0%), la cual es homóloga a un transportador MFS. Lo anterior explicaría la presencia de la segunda banda. Bajo estas circunstancias, en el primer ensayo, para la cepa silvestre se esperarían señales a las 6548 pb y 4986 pb. En las cepas mutantes se esperarían señales a las 5285 pb y 1263 pb. Al parecer esto es lo que se observa en la Figura 22. Al emplear en el segundo ensayo la misma sonda (Figura 23), no se pudo obtener la señal única. En la Figura 18, se esquematiza la estrategia por PCR empleada para la identificación inicial de las transformantes, así como algunos de los resultados de las amplificaciones. De igual forma, en las Figuras 18-23, se muestran los análisis de restricción llevados a cabo para los ensayos de Southern blot, así como los resultados de los mismos.

1. Casete de interrupción al interior del núcleo del hongo (protoplastos de las cepas FB1, FB2 y SG200).



2. Recombinación homóloga.



3. Reemplazo del gen silvestre por el casete introducido.

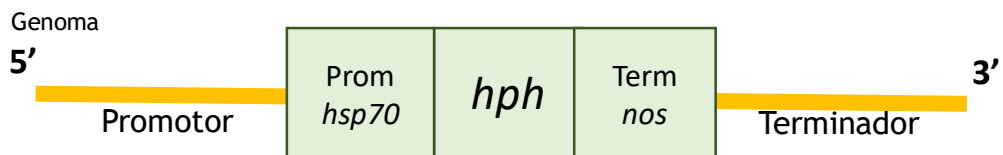


Figura 17. Esquema del reemplazo de un gen silvestre por el casete de interrupción, en el genoma de *U. maydis*.

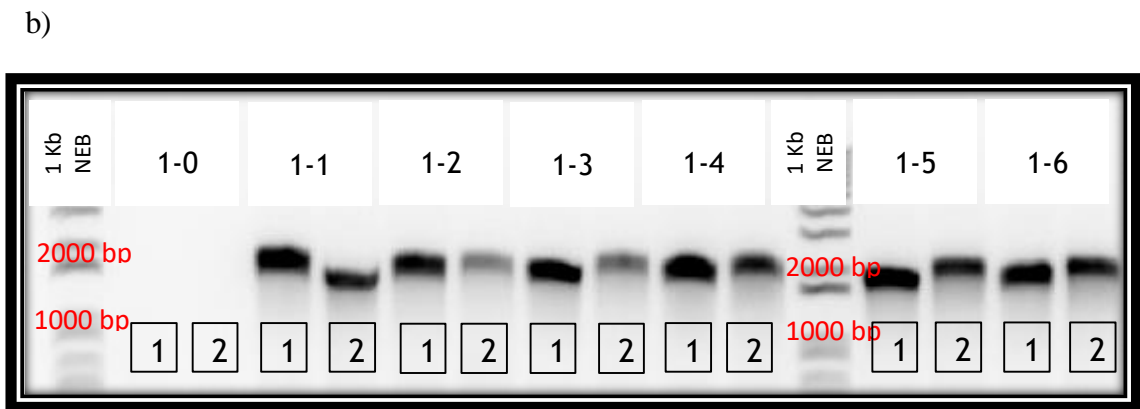
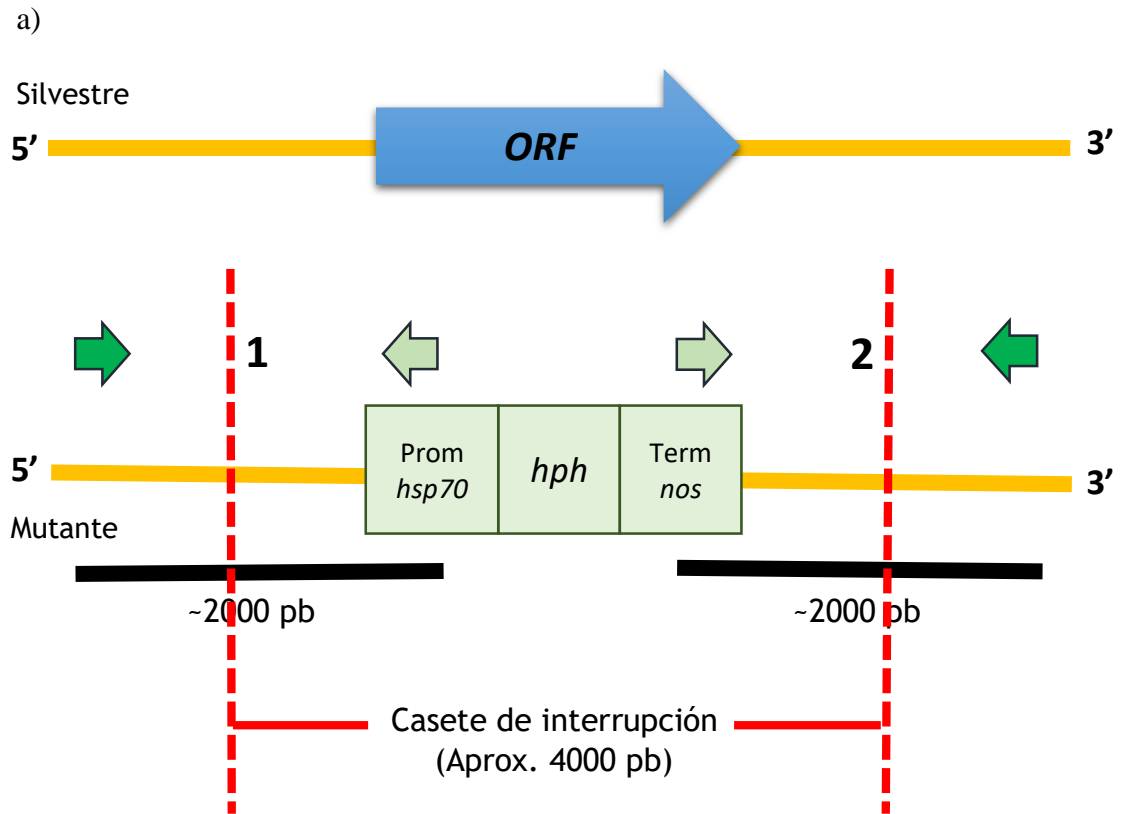


Figura 18. Representación de la validación de las cepas mutantes por PCR. a) Con el propósito de confirmar la mutación de los genes de estudio, se llevaron a cabo reacciones de PCR en DNA genómico de las cepas mutantes presuntivas, utilizando dos combinaciones de iniciadores diseñados de forma que se abarquen, una región que incluya el marcador de selección y una región externa a la empleada para el casete de interrupción, para cada amplificación. b) Amplificaciones por PCR de las regiones señaladas en clonas obtenidas a partir de la transformación del hongo con el casete para la interrupción de *SUV39*. 1-0 (*a1b1*), 1-1 (*a2b2*), 1-2 (*a2b2*), 1-3 (*a2b2*), 1-4 (*a2b2*), 1-5 (*a2b2*), 1-6 (*a2b2*).

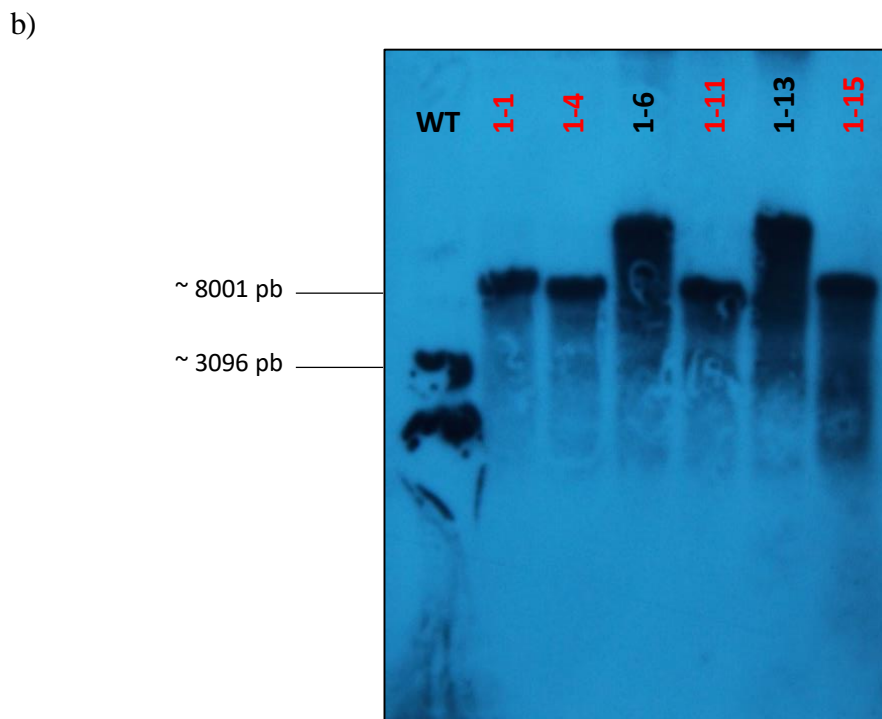
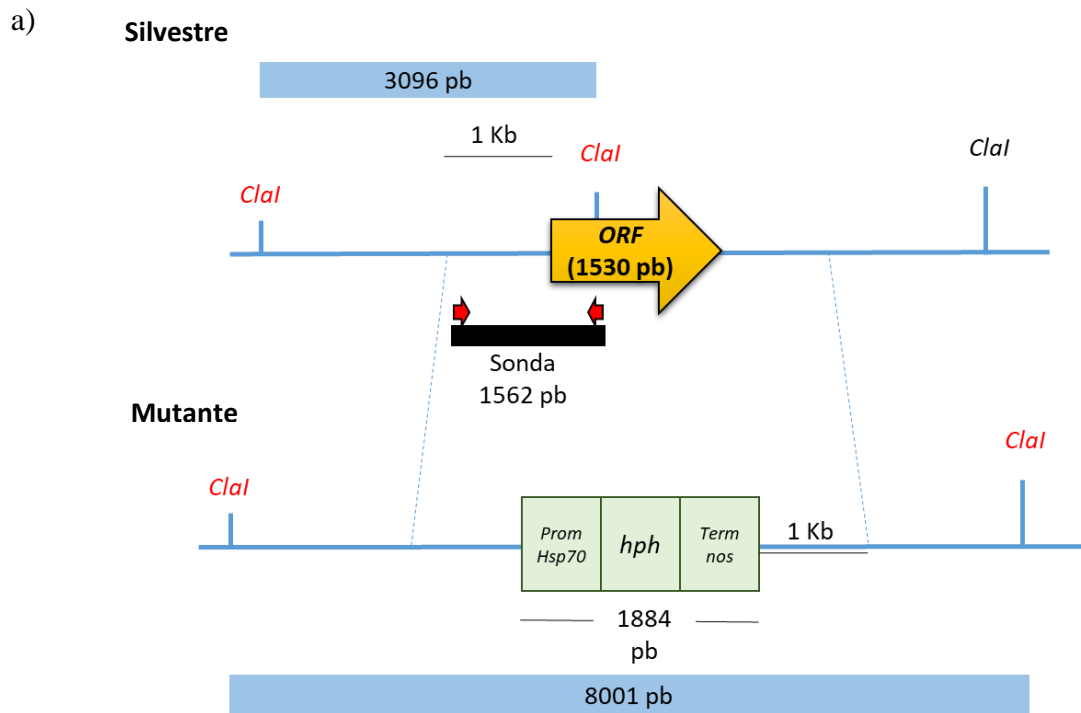


Figura 19. Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de *SUV39*. a) Análisis de restricción de la región cercana a *SUV39* en el genoma de *U. maydis*. El DNA se cortó con *Cla* I. b) Película de rayos X con los resultados del ensayo. Luego de la digestión del DNA y de la hibridación, se buscaba una señal única con tamaño de 8001 pb. WT: cepa silvestre FB1 (*a1b1*), 1-1 (*a2b2*), 1-4 (*a2b2*), 1-6 (*a2b2*), 1-11 (*a2b2*), 1-13 (*a2b2*), 1-15 (*a2b2*). La cepa 1-1 (*a2b2*) se denomina VS1.

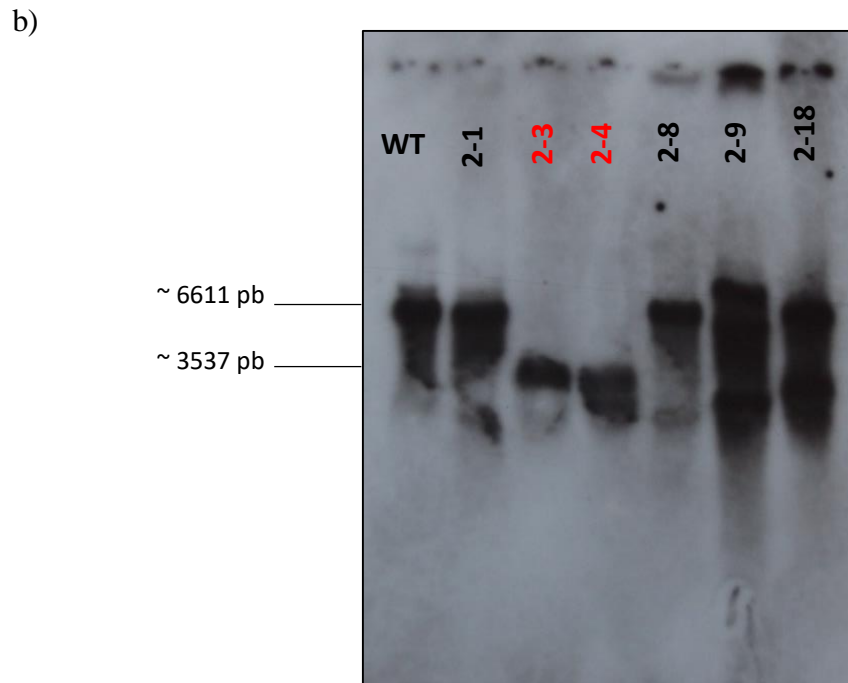
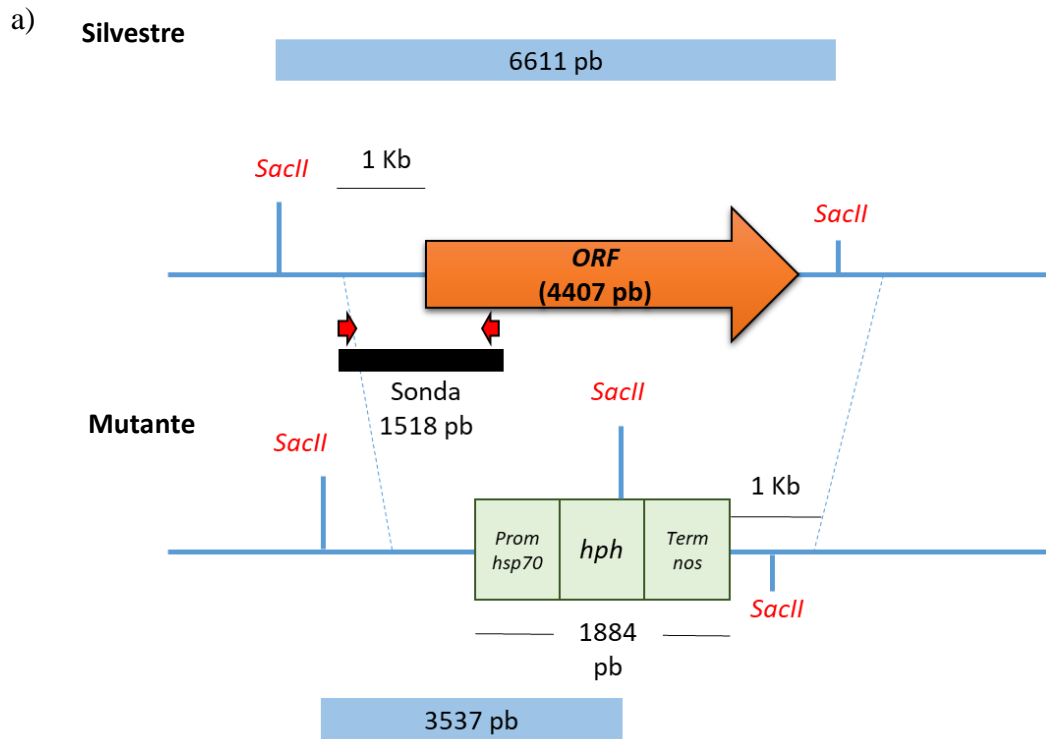


Figura 20. Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de *SET1*. a) Análisis de restricción de la región cercana a *SET1* en el genoma de *U. maydis*. El DNA se cortó con *Sac* II b) Película de rayos X con los resultados del ensayo. Luego de la digestión del DNA y de la hibridación (55 °C), se buscaba una señal única con tamaño de 3537 pb. WT: cepa silvestre FB1 (*alb1*), 2-1 (*alb1*), 2-3 (*alb1*), 2-4 (*alb1*), 2-8 (*a2b2*), 2-9 (*a2b2*), 2-18 (SG200). La cepa 2-4 (*alb1*) se denomina OW4. Las capas 2-9 y 2-18 parecen estar mezcladas con la cepa silvestre.

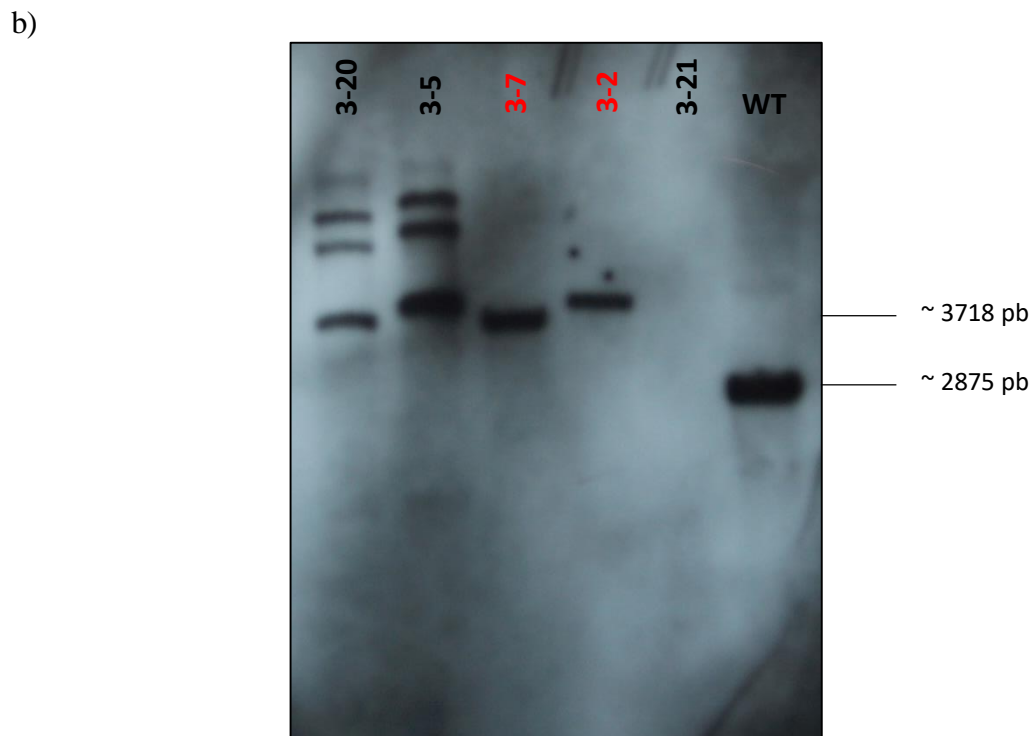
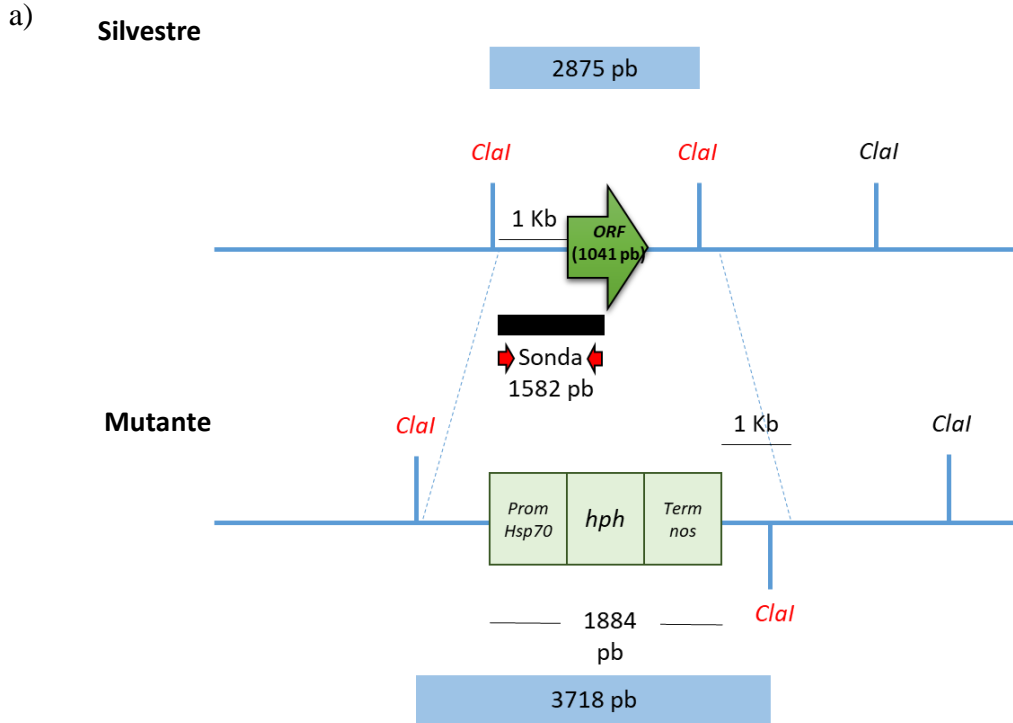


Figura 21. Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de *PRMT1*. a) Análisis de restricción de la región cercana a *PRMT1* en el genoma de *U. maydis*. El DNA se cortó con *Cla* I. b) Película de rayos X con los resultados del ensayo. Luego de la digestión del DNA y de la hibridación (55 °C), se buscaba una señal única con tamaño de 3718 pb. WT: cepa silvestre FB1 (*alb1*), 3-21 (SG200), 3-2 (*alb1*), 3-7 (*a2b2*), 3-5 (*a2b2*), 3-20 (*a2b2*). 3-2 (*alb1*) se denomina AV3 y 3-7 (*a2b2*) se denomina AV6. 3-5 y 3-20 presentan inserciones ectópicas.

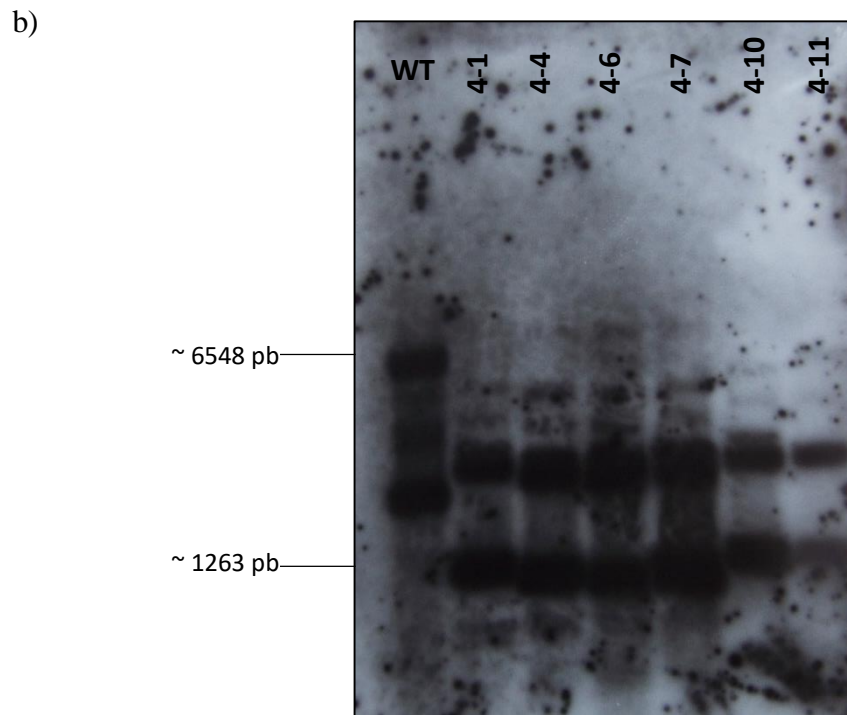
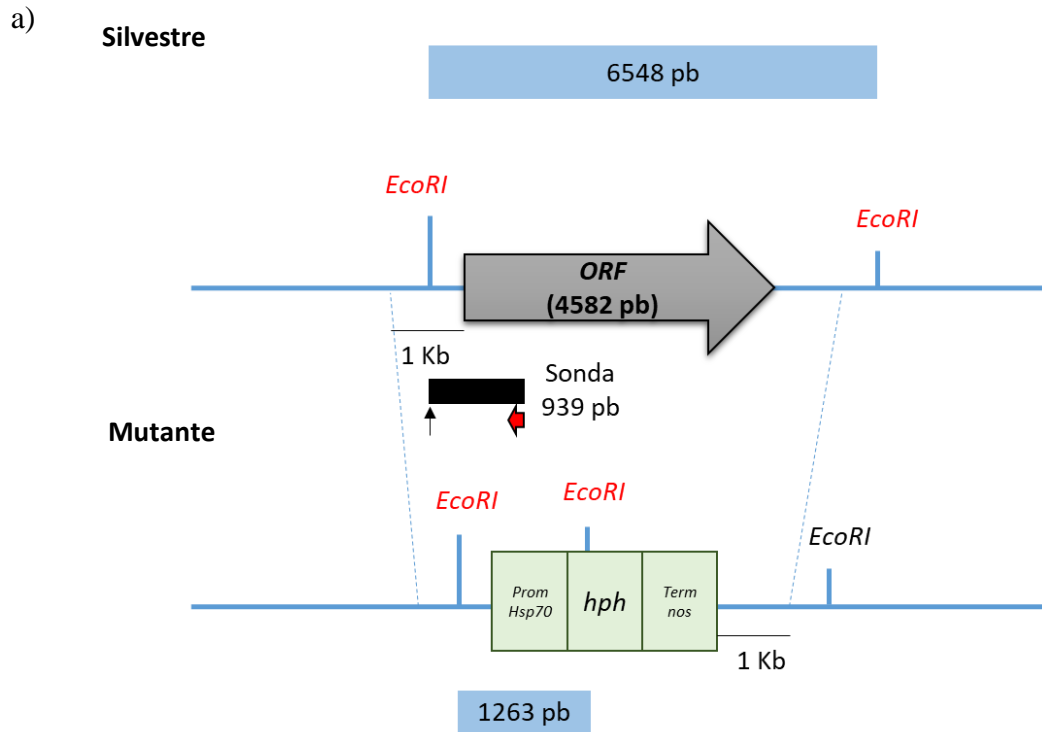
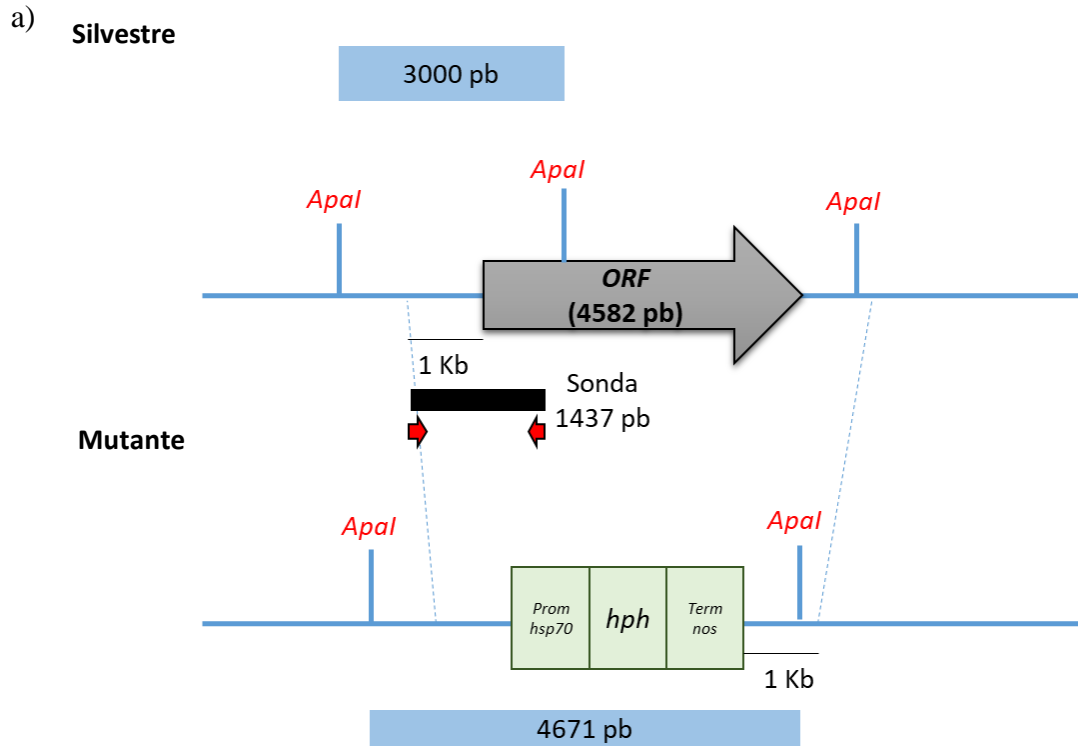


Figura 22. Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de *SIN3*. a) Análisis de restricción de la región cercana a *SIN3* en el genoma de *U. maydis*. El DNA se cortó con *EcoR* I b) Película de rayos X con los resultados del ensayo. Luego de la digestión del DNA y de la hibridación (55 °C), se buscaba una señal única con tamaño de 1263 pb. WT: cepa silvestre FB1 (*alb1*), 4-1 (*alb1*), 4-4 (*alb1*), 4-6 (*alb1*), 4-7 (*alb1*), 4-10 (*a2b2*), 4-11 (*a2b2*). En ningún caso se obtuvo señal única.



b)

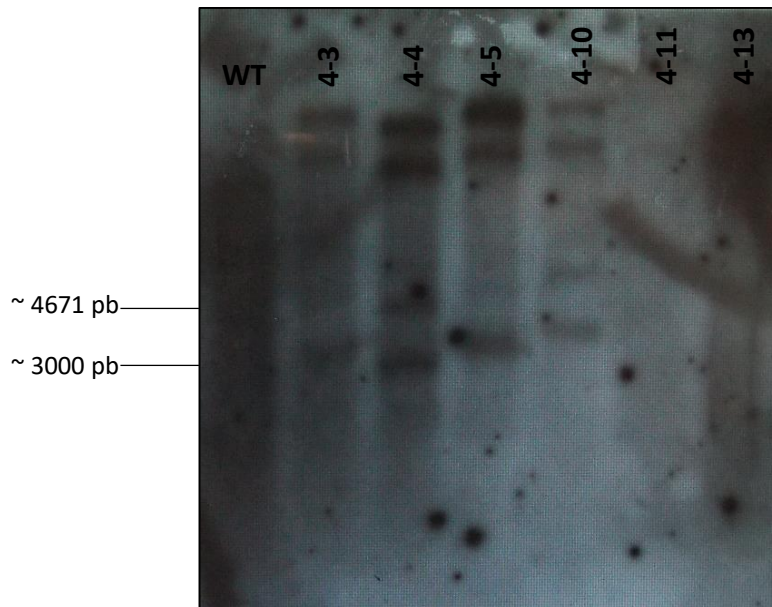


Figura 23. Resultados de la prueba de hibridación de ácidos nucleicos para la búsqueda de mutantes de *SIN3*, empleando un nuevo patrón de restricción. a) Nuevo análisis de restricción de la región cercana a *SIN3* en el genoma de *U. maydis*. El DNA se cortó con *Apa* I. b) Película de rayos X con los resultados del ensayo. Luego de la digestión del DNA y de la hibridación (65 °C), se buscaba una señal única con tamaño de 4671 pb. WT: cepa silvestre FB1 (*a1b1*), 4-3 (*alb1*), 4-4 (*alb1*), 4-5 (*alb1*), 4-10 (*a2b2*), 4-11 (*a2b2*), 4-13 (*a2b2*). En ningún caso se obtuvo señal única.

7.2.5 Aislamiento de segregantes

Los compañeros sexuales de las cepas OW4 (*a1b1ΔSET1*) y VS1 (*a2b2ΔSUV39*), se obtuvieron infectando plántulas de maíz con mezclas de las cepas mutantes y silvestres compatibles. Los tumores producidos se procesaron para la obtención y germinación de las teliosporas. La identificación de las segregantes obtenidas en medio selectivo se realizó por PCR, empleando oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes *pra1*, *pra2*, *bW1*, *bW2* y *hph* (6.2.15). Las cepas confirmadas se denominaron como OW1 (*a2b2ΔSET1*) y VS2 (*a1b1ΔSUV39*).

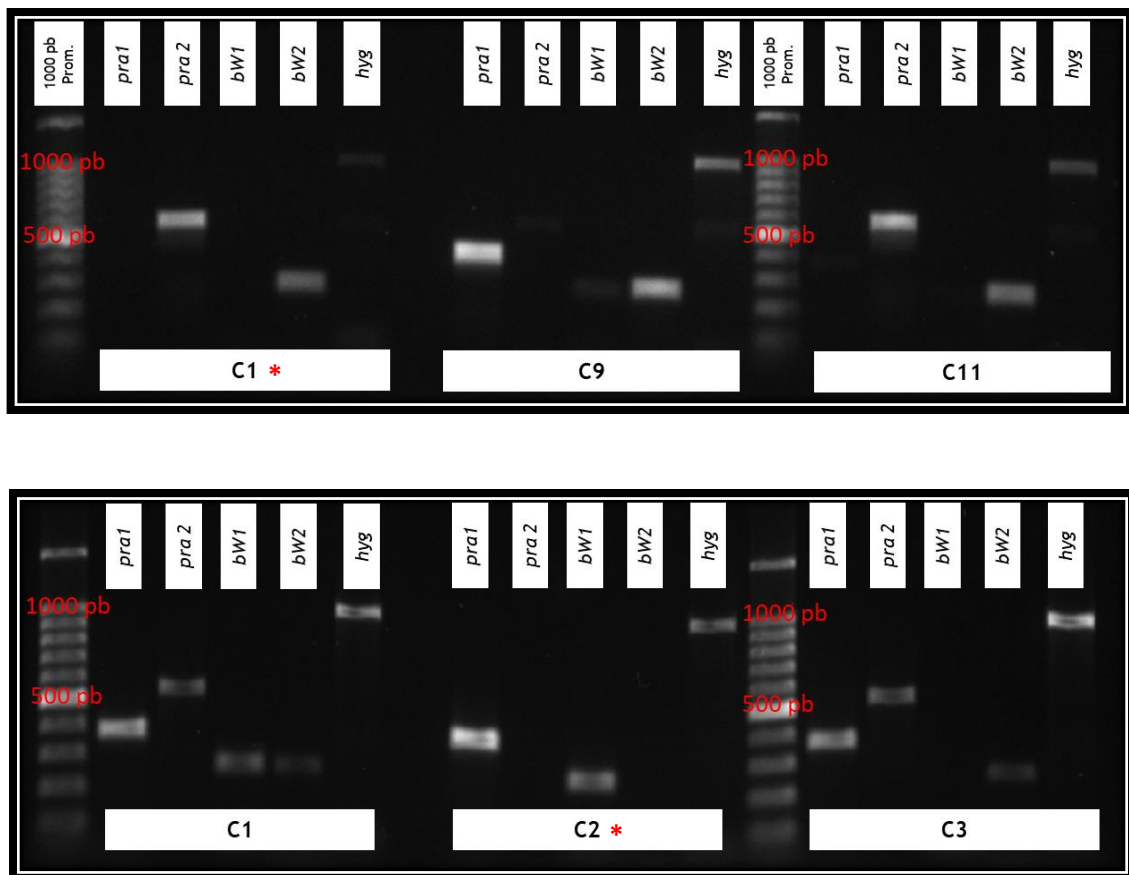


Figura 24. Resultados de la amplificación por PCR de los genes *pra1*, *pra2*, *bW1*, *bW2* y *hph*, a partir del DNA de las segregantes recuperadas. a) Resultados obtenidos a partir de las segregantes producto de la mezcla de OW4 (*a1b1ΔSET1*) X FB2 (*a2b2*). b) Resultados obtenidos a partir de las segregantes producto de la mezcla de FB1 (*a1b1*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*). *pra1*: 396 pb, *pra2*: 579 pb, *bW1*: 267 pb, *bW2*: 267 pb, *hph*: 1026 pb. Se señala con asterisco rojo la cepa escogida por poseer el patrón de amplificación esperado.

7.2.6 Elaboración de los casetes de complementación y retro-transformación de las cepas mutantes

Las construcciones para complementación se elaboraron a partir de la amplificación por PCR de los genes silvestres respectivos, desde la región promotora a la terminadora, y su clonación en el plásmido pCR Blunt II TOPO (Invitrogen) (Apéndices). La orientación de la inserción se verificó por digestión enzimática. De esta forma, se obtuvieron los plásmidos PZ_genSET1 y PZ_genPRMT1, a los cuales, se les incorporó el casete de resistencia a la carboxina proveniente del vector pBS-Cbx (Figura 25).

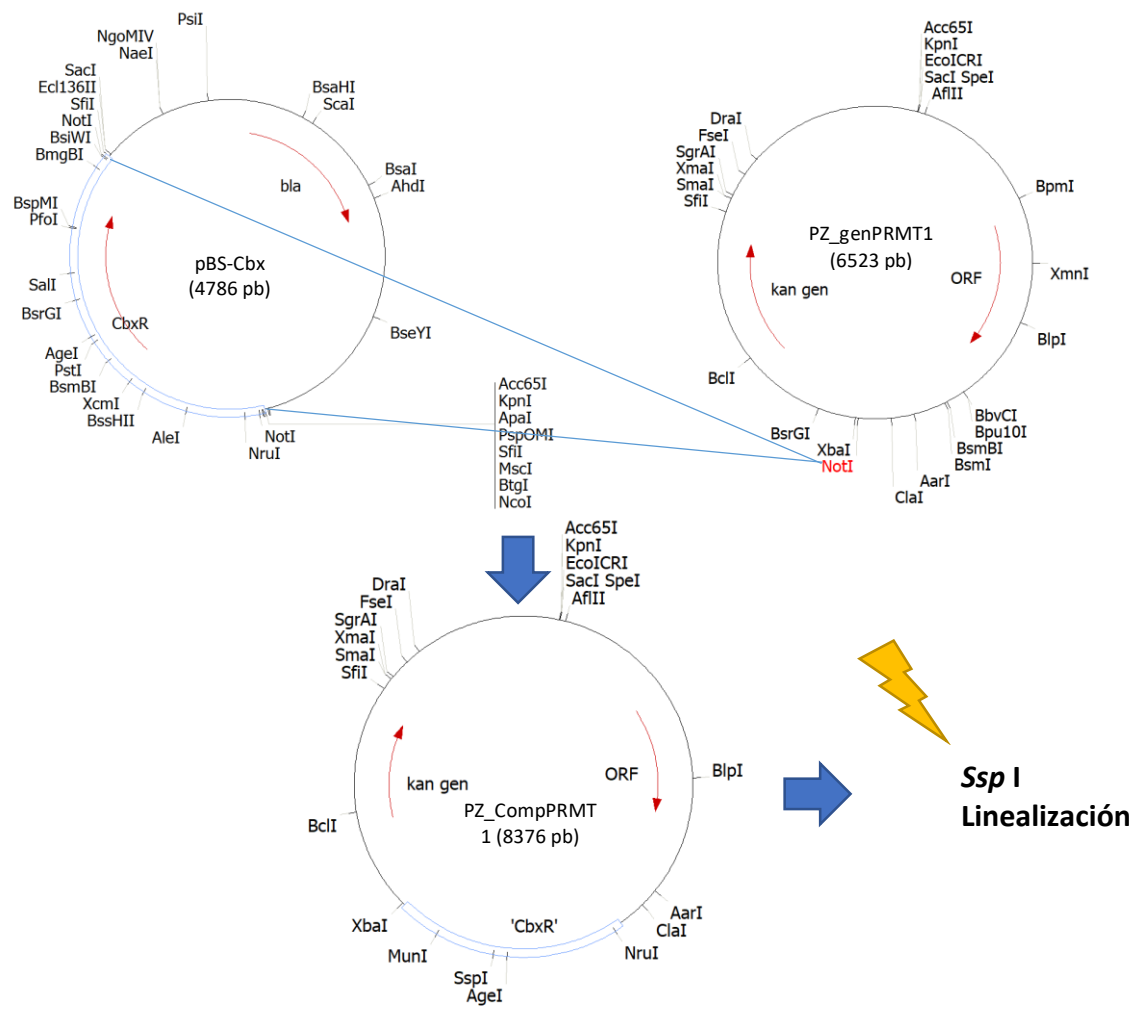


Figura 25. Esquema de la elaboración de las construcciones para complementación. A partir del plásmido pBS-Cbx (izquierda) se escindió el casete de resistencia a la carboxina por digestión con *Not* I. Este casete se ligó al plásmido PZ_genPRMT1 a través del sitio *Not* I (derecha). El plásmido PZ_CompPRMT1 resultante, se cortó con la enzima *Ssp* I para su linealización e introducción a protoplastos de las cepas mutantes.

Los plásmidos que albergan los casetes de complementación se denominaron PZ_CompSET1, PZ_CompPRMT1, y se introdujeron linealizados en protoplastos de las cepas mutantes. A partir del escrutinio de clonas en medio selectivo con carboxina e higromicina, se identificaron por PCR las cepas retro-mutantes COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) y CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) (Figura 26). Las cepas retro-transformantes sexualmente compatibles correspondientes se obtuvieron por medio del aislamiento de las segregantes de las mezclas de COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) x OW1 (*a2b2ΔSET1*) y de CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) x AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) (Figuras 27 y 28). En todos los casos y a lo largo de este proceso, el sexo de las cepas fue verificado por reacción Fuzz.

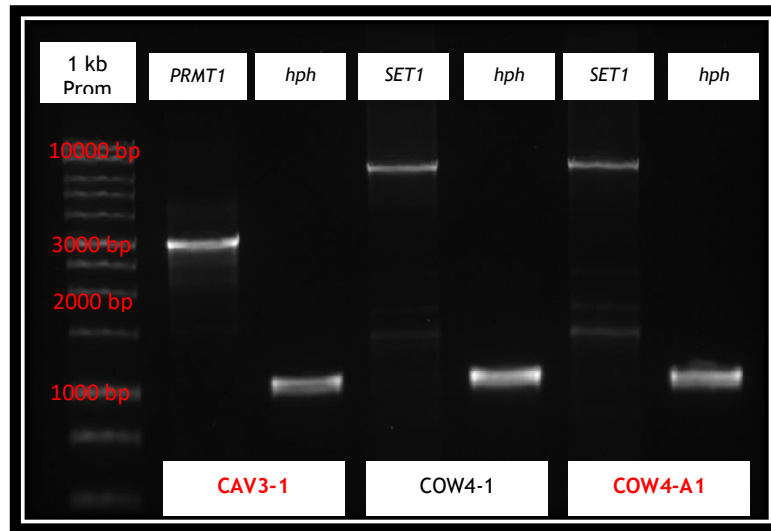
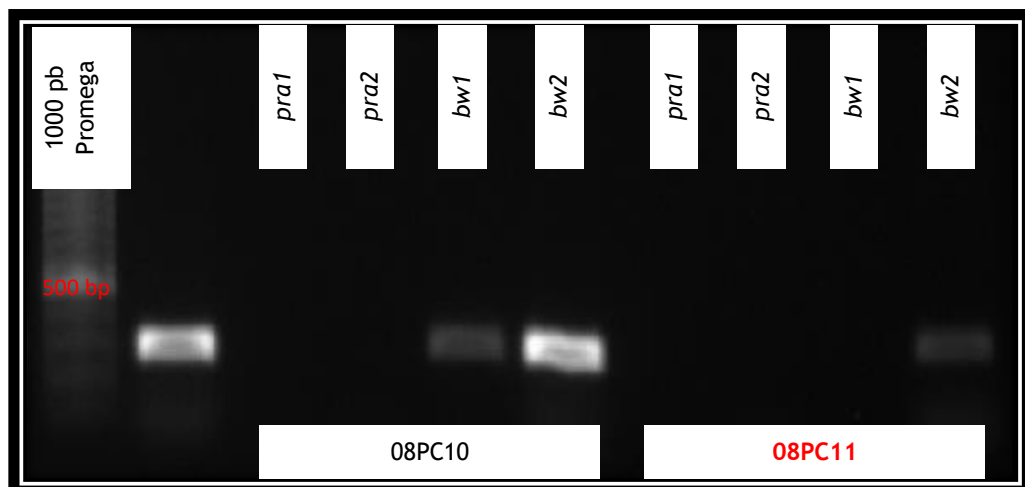


Figura 26. Verificación por ensayo de PCR de la presencia del gen silvestre previamente removido, así como del casete de higromicina empleado para su interrupción, en el DNA de las clonas obtenidas luego del ensayo de complementación. (*PRMT1*: 2999 pb, *SET1*: 6337 pb, *hph*: 1026 pb). Se indica en rojo las clonas seleccionadas en base a su patrón de amplificación.



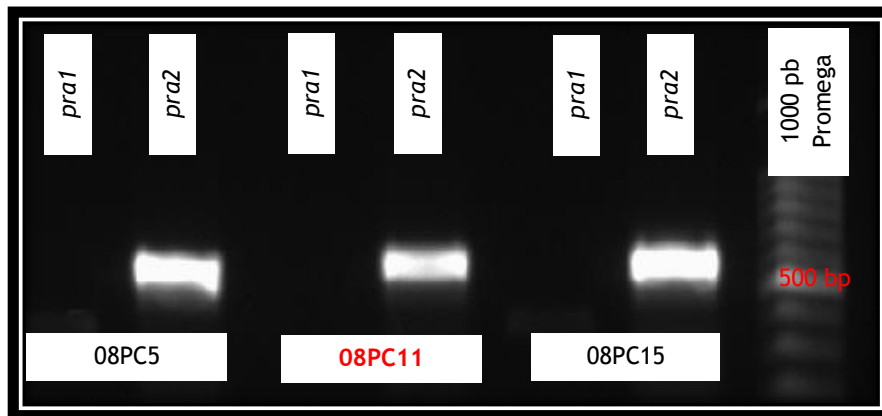


Figura 27. Identificación de segregantes de COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) x OW1 (*a2b2ΔSET1*), del sexo *a2b2*. *pra1*: 396 pb, *pra2*: 579 pb, *bW1*: 267 pb, *bW2*: 267 pb. Se indica en rojo las clonas seleccionadas en base a su patrón de amplificación.

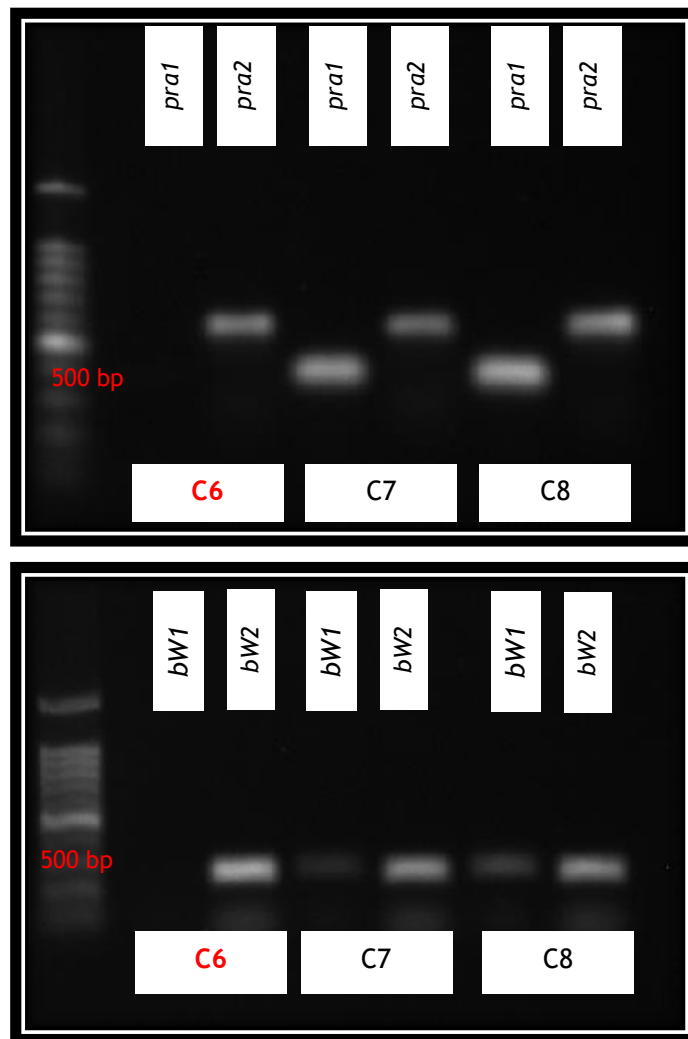


Figura 28. Identificación de segregantes de CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) x AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), del sexo *a2b2*. *pra1*: 396 pb, *pra2*: 579 pb, *bW1*: 267 pb, *bW2*: 267 pb. Se indica en rojo las clonas seleccionadas en base a su patrón de amplificación.

7.3 OBJETIVO 2

Caracterizar fenotípicamente cepas de *U. maydis* afectadas en el gen de estudio

7.3.1 Morfología

La exploración morfológica de las cepas mutantes arrojó resultados diversos. En cuanto a la morfología macroscópica, se encontró que las colonias de las cepas VS2 (*alb1ΔSUV39*) y VS1 (*alb1ΔSUV39*) no presentan alteraciones en la apariencia, forma, tamaño y pigmentación, con respecto a las colonias de las cepas silvestres FB1 (*alb1*) y FB2 (*a2b2*). Las cepas silvestres usualmente forman colonias de tamaño mediano a grande, poseen pigmentación de color crema, son lisas a rugosas, de borde irregular, opacas y suaves al contacto (Figura 29). Microscópicamente, al comparar las células de estas cepas mutantes, con las células de las cepas silvestres, tampoco se observaron diferencias. Las células silvestres normalmente se presentan como estructuras alargadas, en forma de bastón, que poseen una longitud aproximada de 7.5 μm (1.5-10.5 μm) (Figura 30). Por su parte, las colonias de AV3 (*alb1ΔPRMT1*) y AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) evidencian ligeras diferencias con respecto a las colonias de fenotipo silvestre. Al observar en detalle el crecimiento de las colonias mutantes, el primer hallazgo apreciable es que presentan una mayor rugosidad, debido a que los pliegues que forman son más pronunciados. El segundo hallazgo es que el tamaño entre colonias de la misma cepa es variable, en un rango que va de colonias pequeñas a medianas, pero no grandes. Como en el caso anterior, la morfología microscópica de las cepas mutantes se mantiene intacta, sin alteraciones (Figura 29).

Las colonias de las cepas OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*) se caracterizan por ser puntiformes, umbilicadas, opacas, de pigmentación café oscuro, borde regular y consistencia arenosa. La pigmentación es más intensa en el reverso de la caja y se incrementa a medida que avanza el tiempo de incubación, siendo evidente desde las 48 h (Figura 29). Al microscopio, aproximadamente el 80% de las células de estas colonias presentan una morfología modificada, muy alargada, formando micelios cortos segmentados. En algunos de estos micelios pequeños se pueden observar segmentos

vacíos desprovistos de citoplasma. A diferencia de las colonias de FB1 (*alb1*) y de FB2 (*a2b2*), las colonias de OW4 (*alb1ΔSET1*) y de OW1 (*a2b2ΔSET1*) son difíciles de resuspender en agua para su observación. En concordancia con el hallazgo anterior, las células de OW4 (*alb1ΔSET1*) y de OW1 (*a2b2ΔSET1*) son más largas y delgadas respecto a las células silvestres cuando crecen en medio líquido. La longitud de las células mutantes se incrementa en tanto lo hace el tiempo de incubación (Figura 31). Cuando estas cepas se cultivan en MM líquido, el caldo adquiere la pigmentación café característica.

La tinción con calcofluor no reveló alteraciones en la formación de la pared celular o de los septos de división de las cepas mutantes. En el caso de las cepas OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*), en ocasiones no ocurre la separación por el septo entre las células madre e hija al dividirse, dando lugar a la formación de los micelios septados cortos (Figuras 32 y 33). La reintroducción del gen *SET1* en el locus de carboxina, revierte los cambios morfológicos macroscópicos y microscópicos descritos (Figura 34).

7.3.2 Crecimiento

El crecimiento de las cepas mutantes se evaluó a través de una cinética de crecimiento en MM y ensayos de crecimiento relativo en agar. El análisis estadístico de los resultados de la cinética de crecimiento indica que existen diferencias en el crecimiento asociadas a las cepas ($F=13.383$, $p= 0.002$). De acuerdo a la prueba de Tukey, las cepas se agrupan en dos subconjuntos, como se observa en el Cuadro 8. La cepa AV3 (*alb1ΔPRMT1*) mostró un crecimiento similar al de la cepa silvestre FB1 (*alb1*), sin embargo, ambas son superadas por la cepa VS2 (*alb1ΔSUV39*). A pesar de que la cepa OW4 (*alb1ΔSET1*) se agrupa con VS2 (*alb1ΔSUV39*), es probable que el incremento en los valores de absorbancia de esta, registrados en los tiempos finales de la prueba, obedezca a absorbancia asociada con la pigmentación café que adquiere el MM a medida que avanza el tiempo de incubación, y no a un mayor crecimiento por parte de OW4 (*alb1ΔSET1*) (Figura 35). El ensayo de crecimiento relativo en MC no reveló diferencias en el crecimiento de las cepas mutantes respecto a las cepas silvestres (Figura 36).

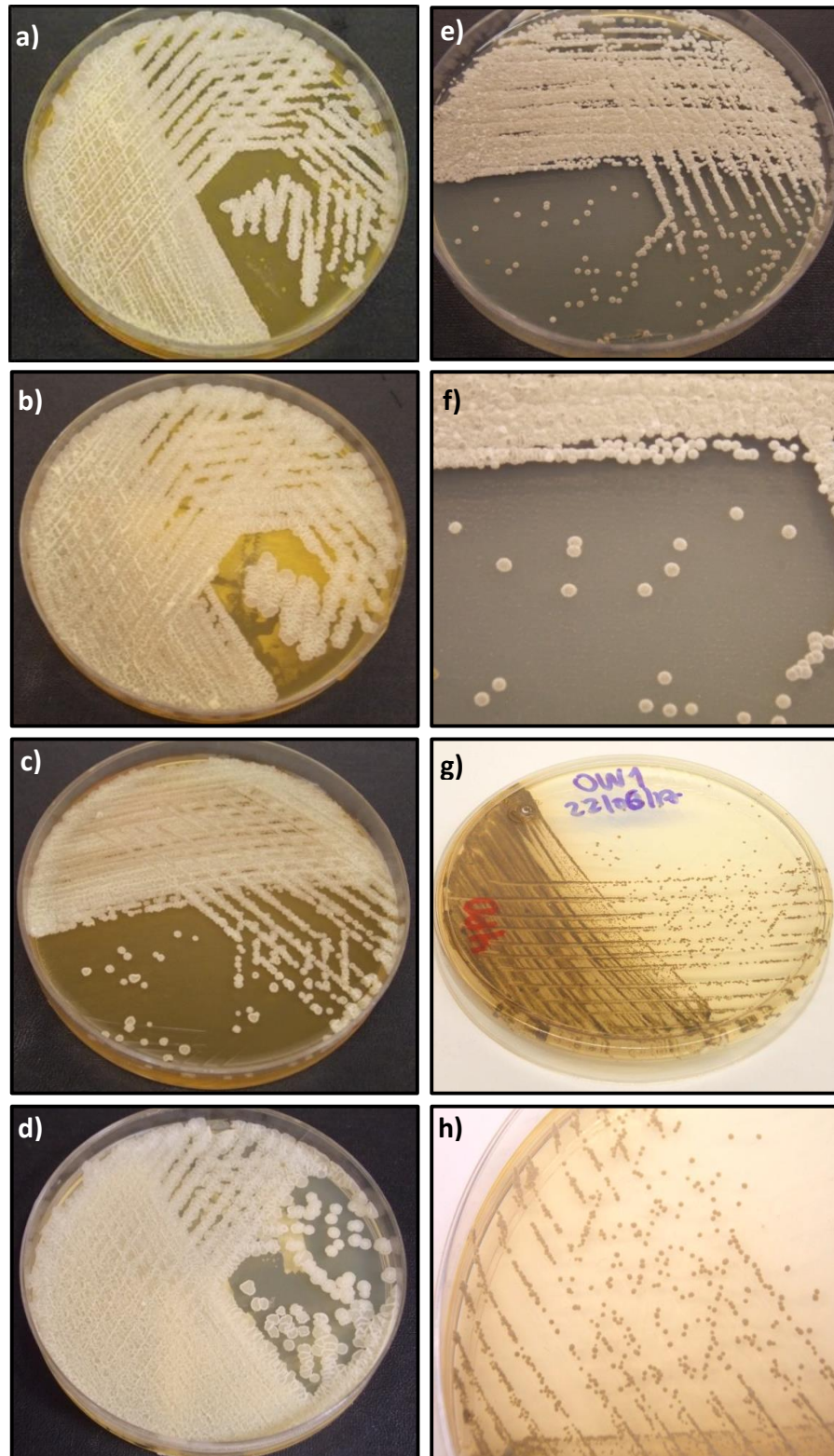


Figura 29. Morfología colonial de las cepas silvestres y mutantes en YPD, 72 h, 28 °C. a) FB1 (*alb1*) b) FB2 (*a2b2*), c) AV3 (*alb1ΔPRMT1*), d) VS1 (*a2b2ΔSUV39*), e) OW4 (*alb1ΔSET1*), f) Detalle de OW4 (*alb1ΔSET1*), g) OW1 (*a2b2ΔSET1*), h) Detalle de OW1 (*a2b2ΔSET1*). Se observa la pigmentación café de las colonias de OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*).

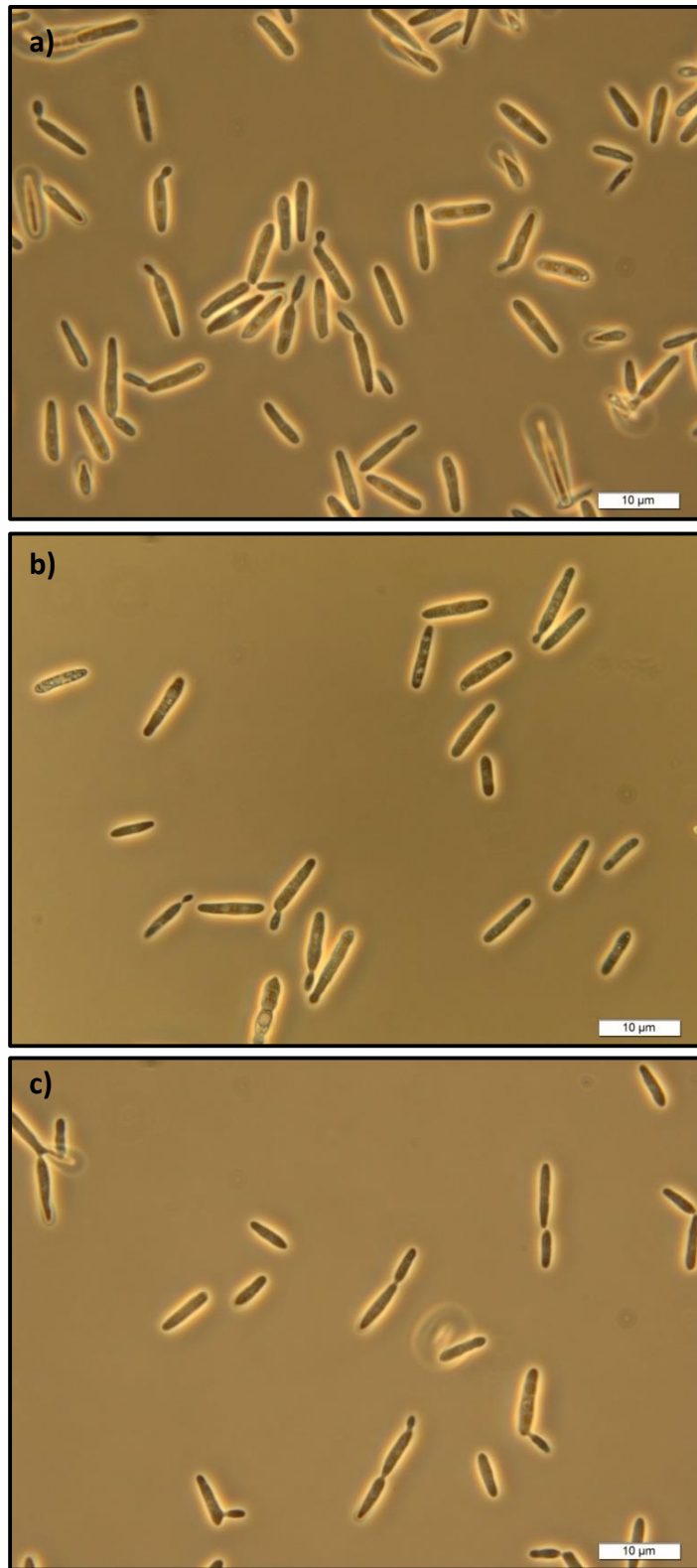


Figura 30. Morfología celular de a) FB2 (*a2b2*), b) VS1 (*a2b2ΔSUV39*), c) AV3 (*alb1ΔPRMT1*). Contraste de fase, 100X, Ph 3, tamaño de la barra: 10 μm.

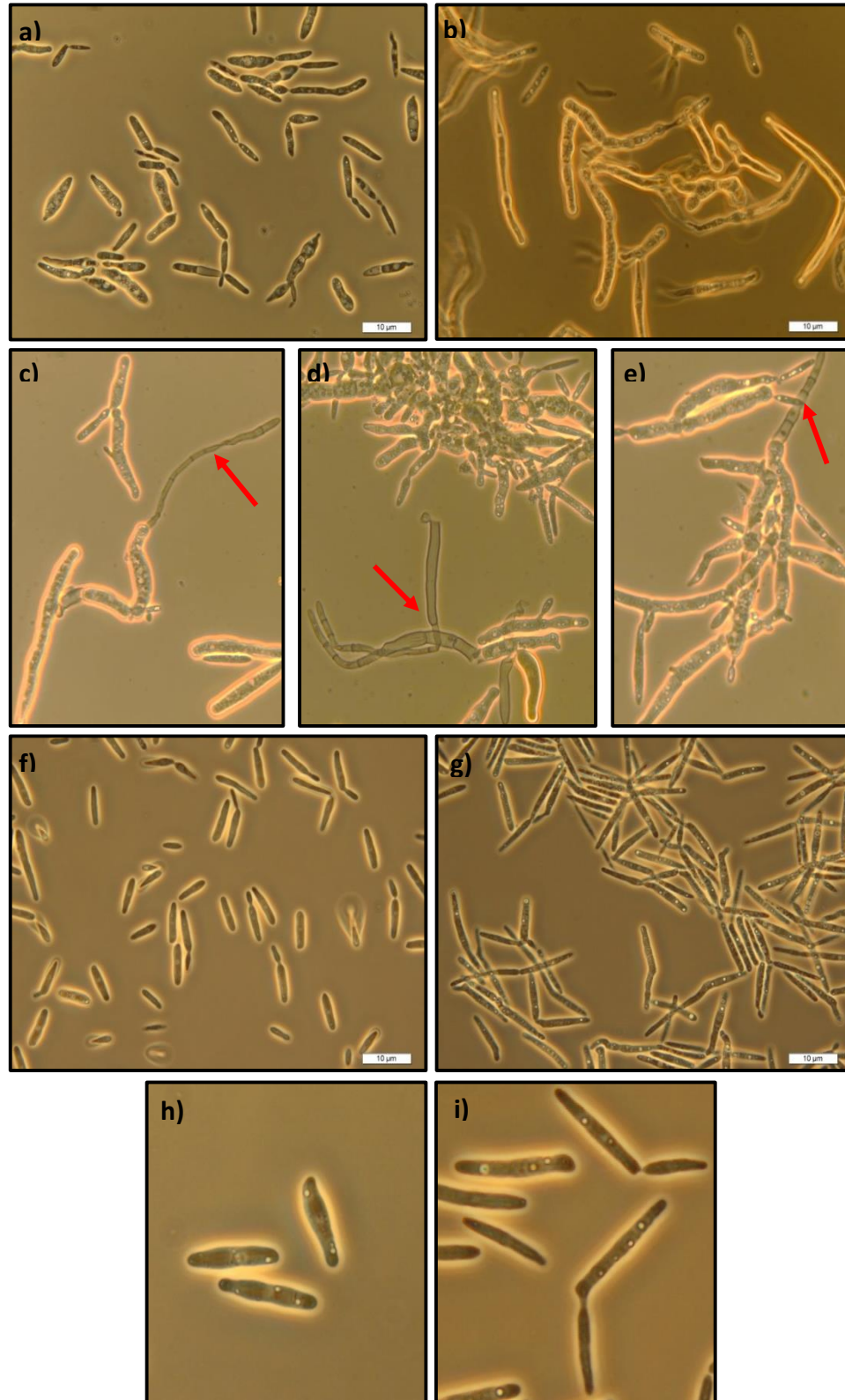


Figura 31. Morfología celular de FB1 (*alb1*) y OW4 (*alb1ΔSET1*). a) Células de una colonia de FB1 (*alb1*), b) Células de una colonia de OW4 (*alb1ΔSET1*), c-e) Micelio desprovisto de citoplasma en células de una colonia de OW4 (*alb1ΔSET1*), f y h) Células de FB1 (*alb1*), g e i) Células de OW4 (*alb1ΔSET1*). Contraste de fase, 100X, Ph 3, tamaño de la barra: 10 μm.

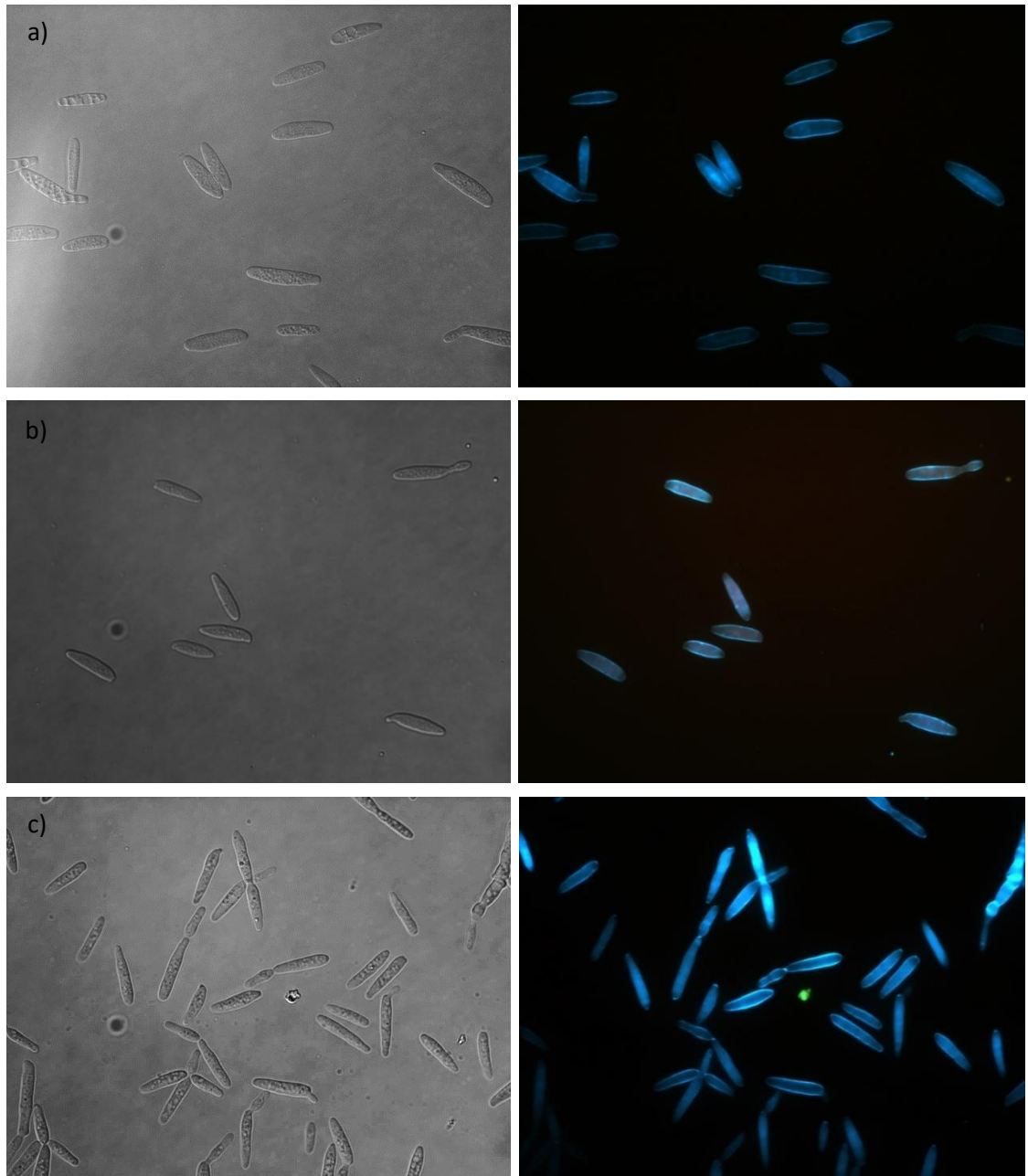


Figura 32. Tinción con calcofluor blanco de las células de a) FB1 (*alb1*), b) VS1 (*a2b2ΔSUV39*), c) AV3 (*alb1ΔPRMT1*). Panel de la izquierda: DIC, 100X, panel de la derecha: fluorescencia, 100X.

Empleando ese mismo método se evaluó el crecimiento de las cepas en varias temperaturas y fuentes de carbono. En agar YPD, a temperaturas de incubación de 37 °C y 17 °C, las cepas mutantes VS2 (*alb1ΔSUV39*) y VS1 (*a2b2ΔSUV39*) no evidenciaron diferencias en el crecimiento respecto a la contraparte silvestre en las mismas condiciones. Las cepas AV3 (*alb1ΔPRMT1*) y AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) se mostraron sensibles a ambas

temperaturas, principalmente a la de 37 ° C, observándose un notable retraso en el crecimiento. La cepa complementada CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) tuvo igual comportamiento que la cepa silvestre. En cuanto a OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*), su crecimiento está ligeramente retrasado en ambas temperaturas. Las cepas pierden la capacidad de sintetizar el pigmento café a temperatura de 17 ° C (Figuras 37 y 38). La síntesis de este pigmento es dependiente de la temperatura (Figura 39). La cepa COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) muestra un crecimiento equivalente al de la cepa silvestre, en ambas condiciones (Figuras 37 y 38).

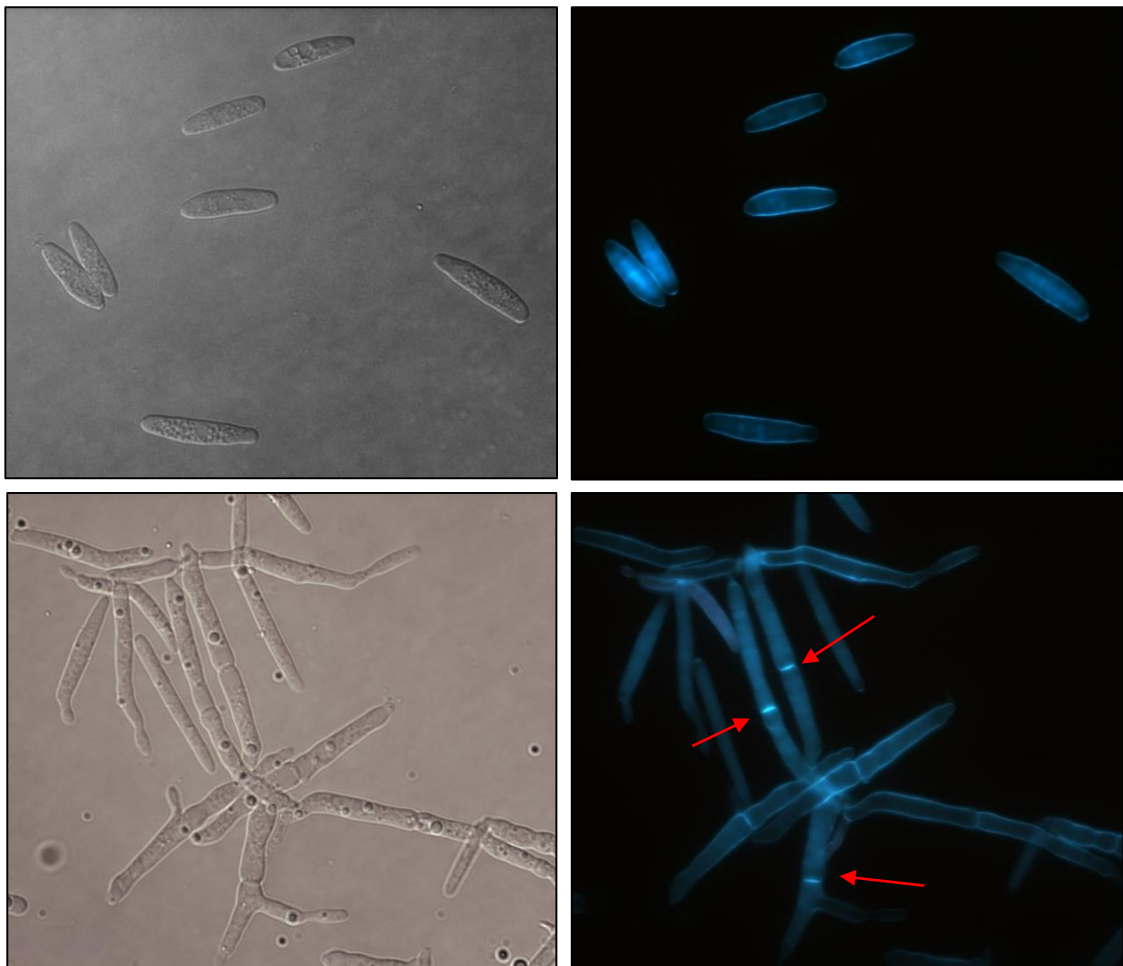


Figura 33. Tinción con calcofluor blanco de las células de a) FB1 (*alb1*), b) OW1 (*a2b2ΔSET1*). Panel de la izquierda: DIC, 100X, panel de la derecha: fluorescencia, 100X.

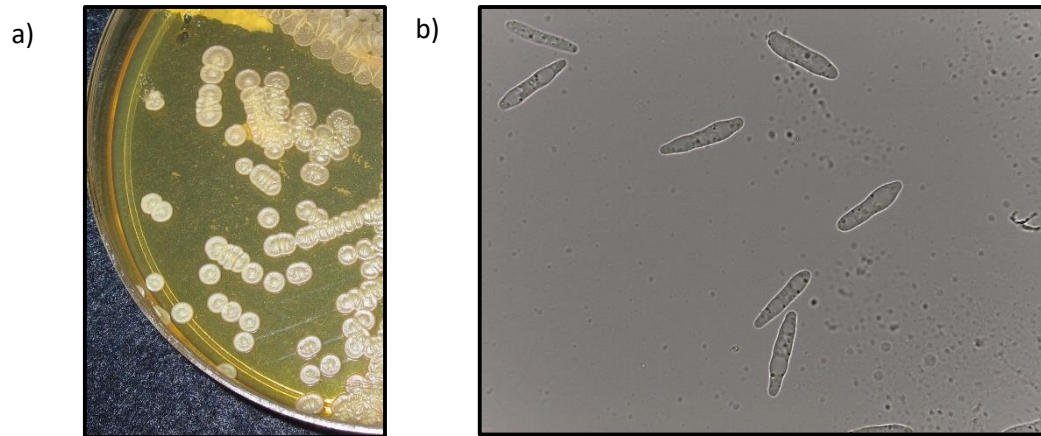


Figura 34. Reversión del fenotipo mutante por la remoción del gen *SET1*, luego del ensayo de complementación. a) Colonias de COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*). b) Células de COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*), campo claro, 100X.

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Tukey para la determinación de diferencias en el crecimiento de las cepas evaluadas.

| Cepa | N | Subconjunto | |
|---------------------------|---|-------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| AV3 (<i>a1b1ΔPRMT1</i>) | 3 | ,300233 | |
| FB1 (<i>a1b1</i>) | 3 | ,304767 | |
| VS2 (<i>a1b1ΔSUV39</i>) | 3 | | ,377833 |
| OW4 (<i>a1b1ΔSET1</i>) | 3 | | ,383475 |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Alfa = ,05.

Respecto al crecimiento en fuentes de carbono alternativas, este se evaluó en maltosa, glicerol y sacarosa. Las cepas mutantes se desarrollaron de igual forma que las silvestres en todos los casos, por lo que no se encontraron retrasos en el desarrollo (Figuras 40, 41 y 42). No obstante, en las cepas OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*) se observó la pérdida de la capacidad para sintetizar el pigmento café en presencia de glicerol. La síntesis de este pigmento también es dependiente de la fuente de carbono (Figura 43).

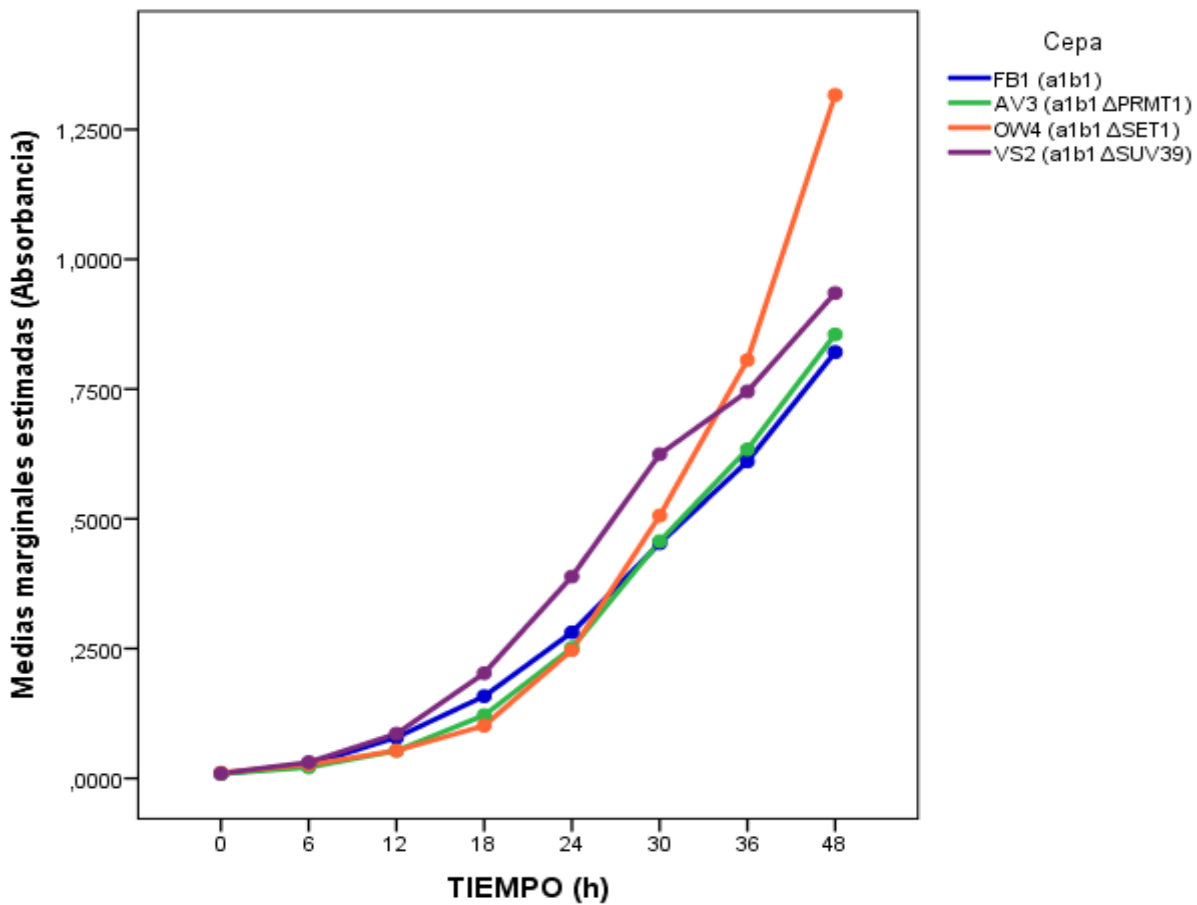


Figura 35. Cinética de crecimiento en MM de las cepas FB1 (*a1b1*), AV3 (*a1b1*Δ*PRMT1*), OW4 (*a1b1*Δ*SET1*) y VS2 (*a1b1*Δ*SUV39*). El disparo en la absorbancia de la cepa OW4 (*a1b1*Δ*SET1*) puede explicarse por la acumulación del pigmento café oscuro, a lo largo del tiempo. El crecimiento de VS2 (*a2b2*Δ*SUV39*) es significativamente mayor que el de las cepas restantes.

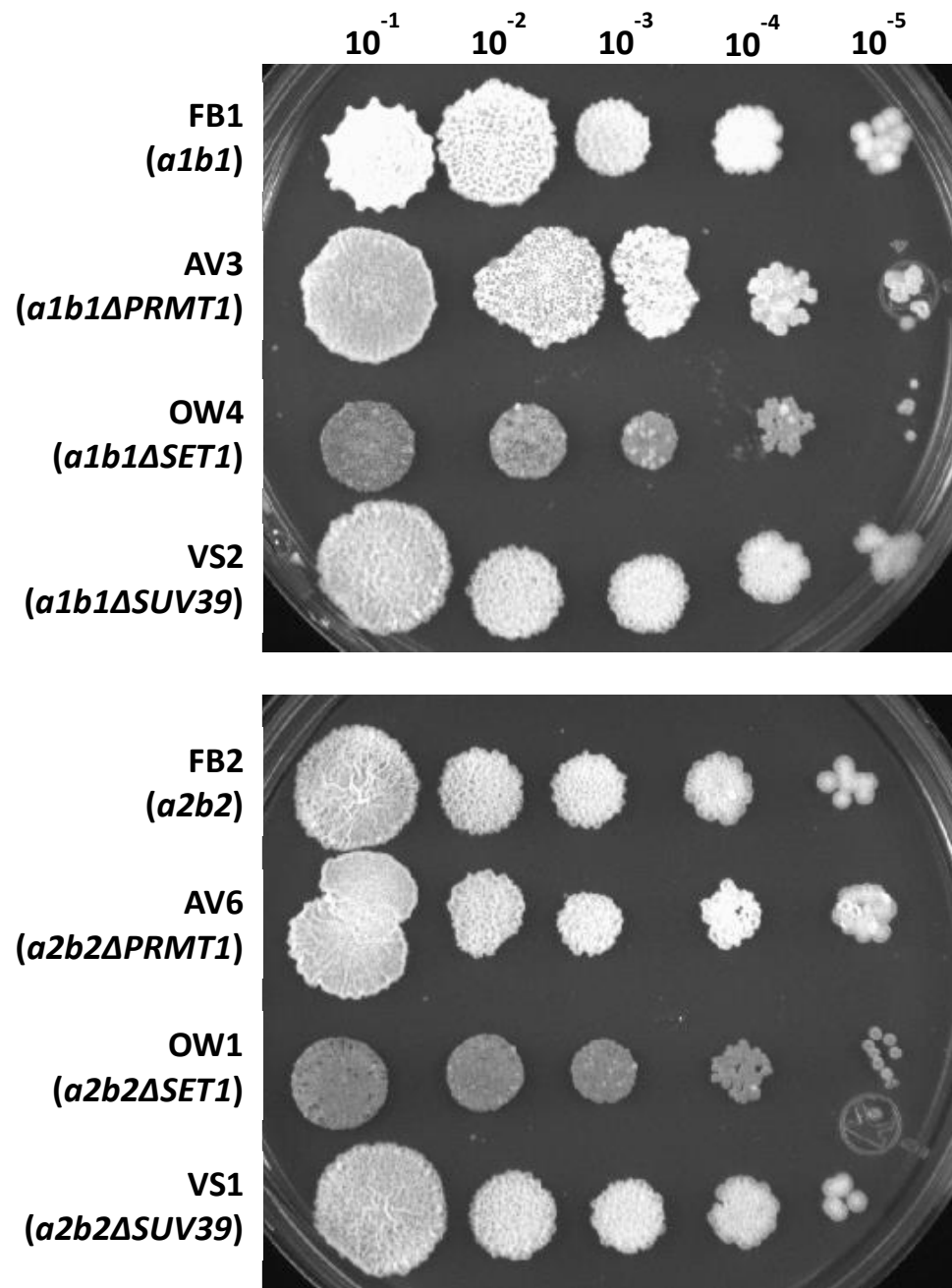


Figura 36. Ensayo de crecimiento relativo en agar MC, 28 °C, 72 h. 2 repeticiones.

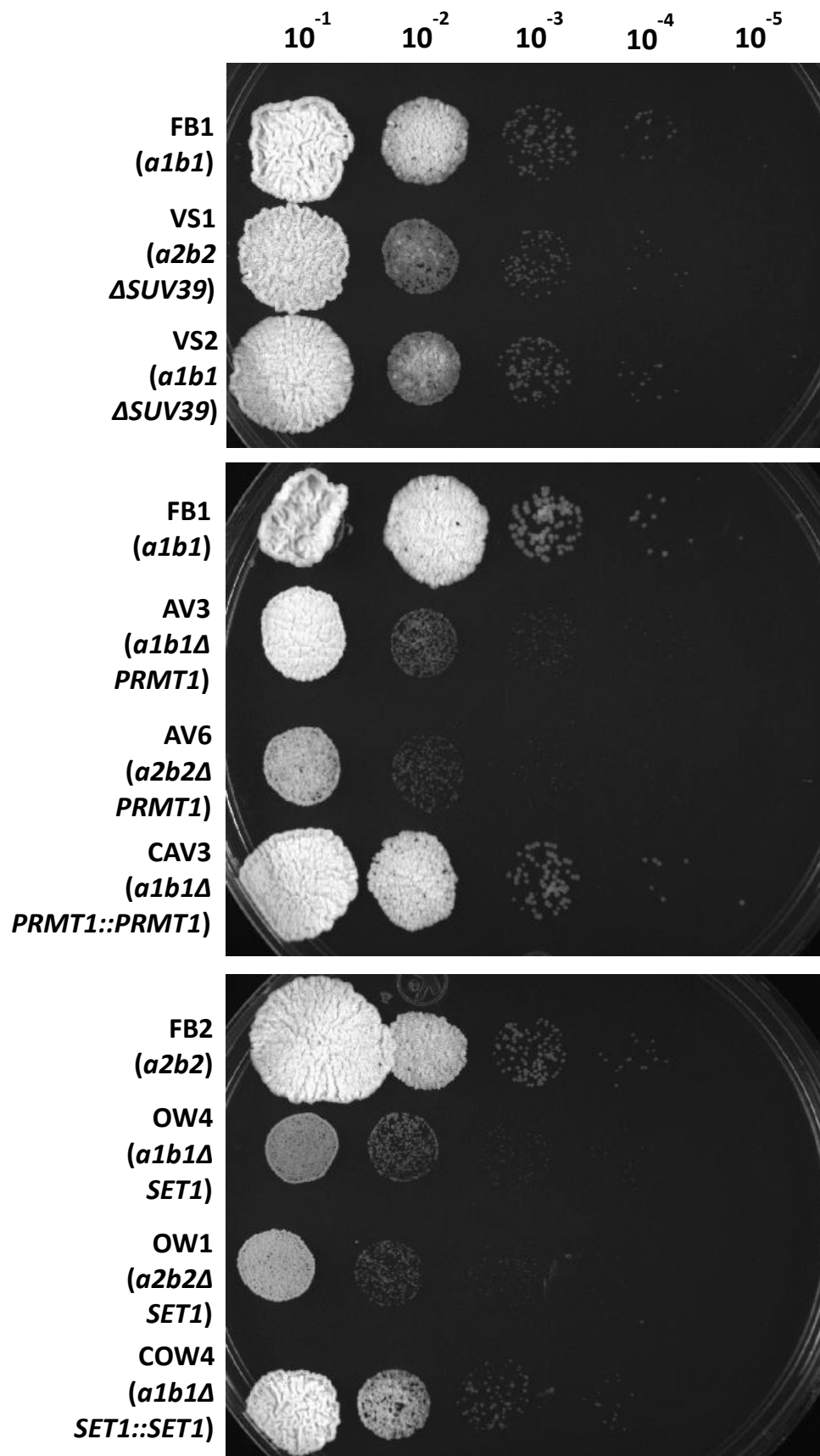


Figura 37. Evaluación del crecimiento en agar YPD a una temperatura de incubación de 37 °C, 48 h, 3 repeticiones.

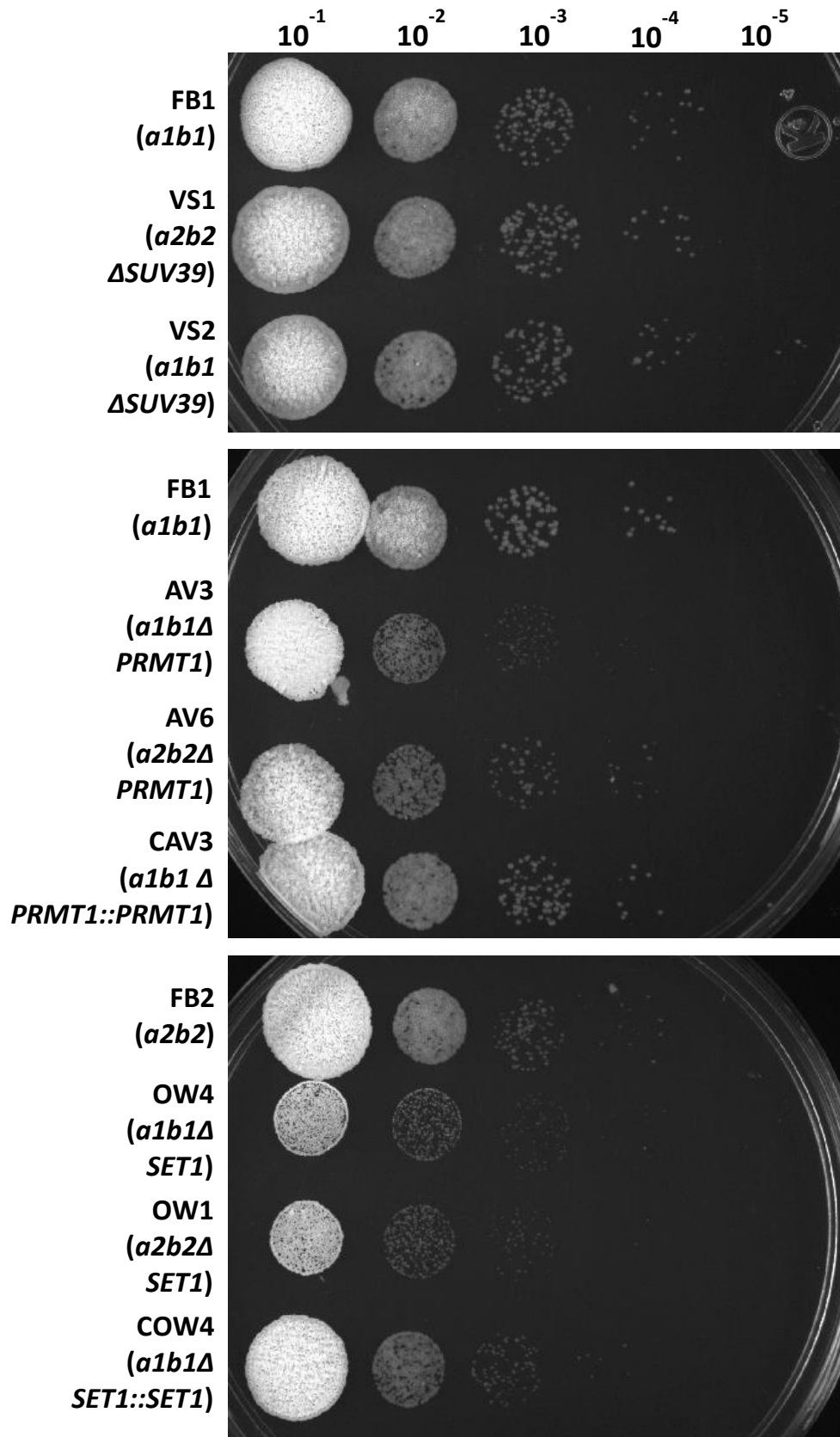


Figura 38. Evaluación del crecimiento en agar YPD a una temperatura de incubación de 17 °C, 72 h, 3 repeticiones.

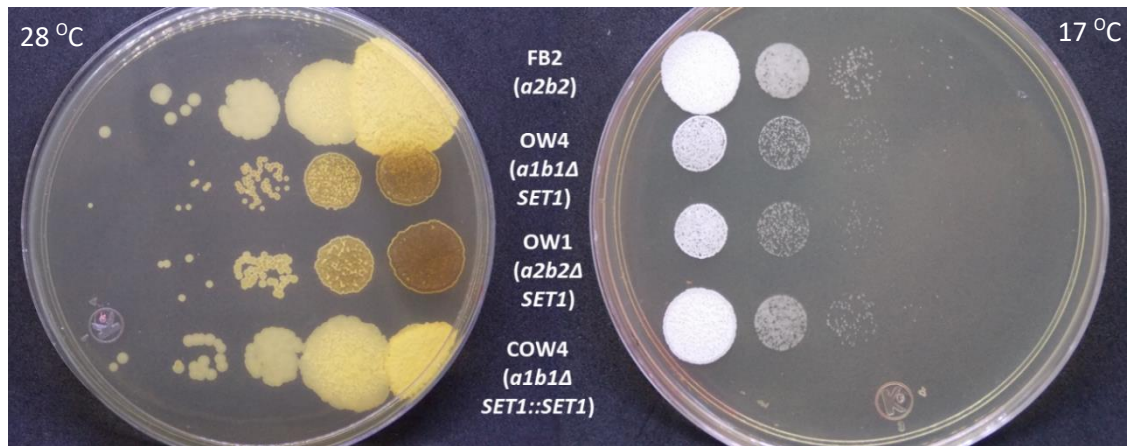


Figura 39. La síntesis del pigmento en las cepas mutantes de *SET1* es dependiente de la temperatura.

7.3.3 Reacción Fuzz

Como se mencionó previamente, el ensayo de reacción Fuzz se empleó para la confirmación del sexo de las cepas a lo largo de los procesos de generación de mutantes y aislamiento de segregantes. No obstante, esta es una herramienta útil para el establecimiento de la función de los genes interrumpidos, en la conjugación y fusión de células sexualmente compatibles de *U. maydis*. Producto de los resultados obtenidos a partir de las combinaciones de cepas realizadas, se estableció que no existen alteraciones en la capacidad de apareamiento en las cepas mutantes, con excepción de las de la mezcla AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), las cuales evidencian una reducción de la intensidad de la reacción al aparearse entre sí. En los casos donde las reacciones resultaron normales, se presume que los genes ausentes en esas cepas no son necesarios durante esta etapa del ciclo de vida del hongo y viceversa (Figuras 44, 45 y 46).

7.3.4 Transición dimórfica por pH

U. maydis es un organismo dimórfico que tiene la capacidad de filamentar a pH ácido. Se evaluó si las cepas mutantes generadas mantenían la capacidad de filamentar en esta condición. Se encontró en todos los casos que dicha capacidad se mantiene, sin embargo, en el caso de la cepa OW4 (*a1b1ΔSET1*) se observa que la filamentación es mayor y más rápida (hiperfilamentación) (Figuras 47 y 48).

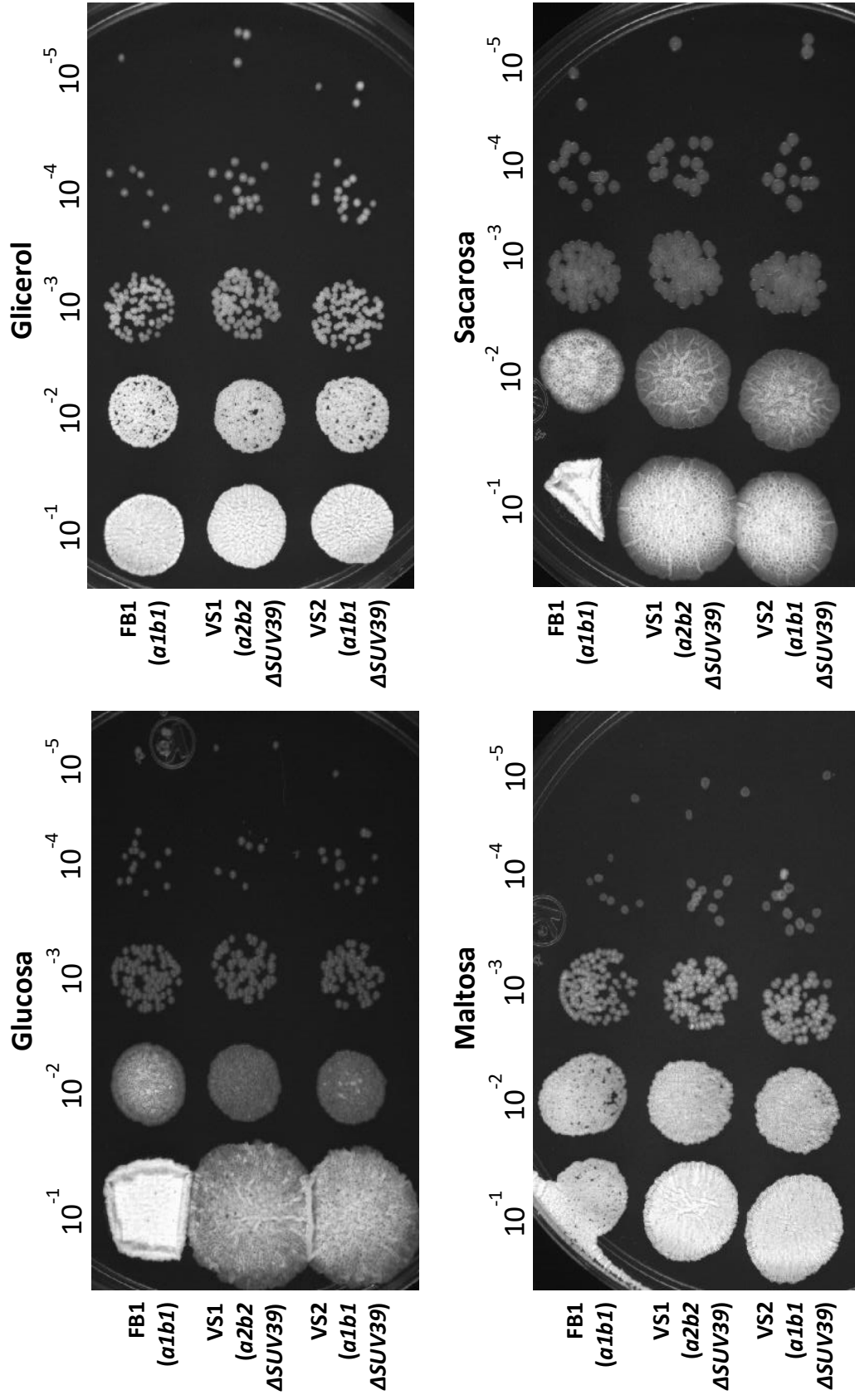


Figura 40. Resultados del ensayo de crecimiento en diversas fuentes de carbono para las cepas mutantes en *SUV39*. Se llevaron a cabo 3 repeticiones.

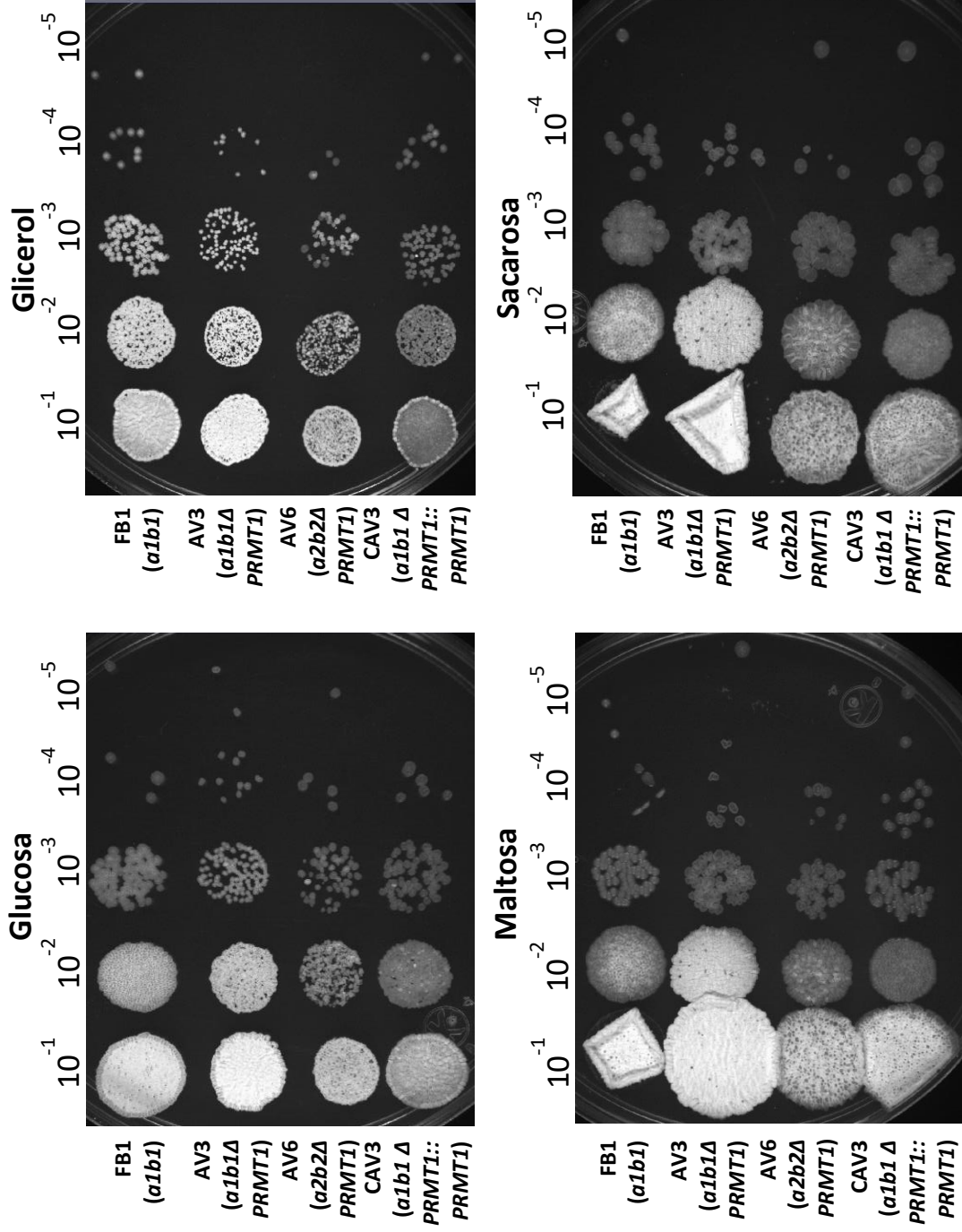


Figura 41. Resultados del ensayo de crecimiento en diversas fuentes de carbono para las cepas mutantes en *PRMT1*. Se llevaron a cabo 3 repeticiones.

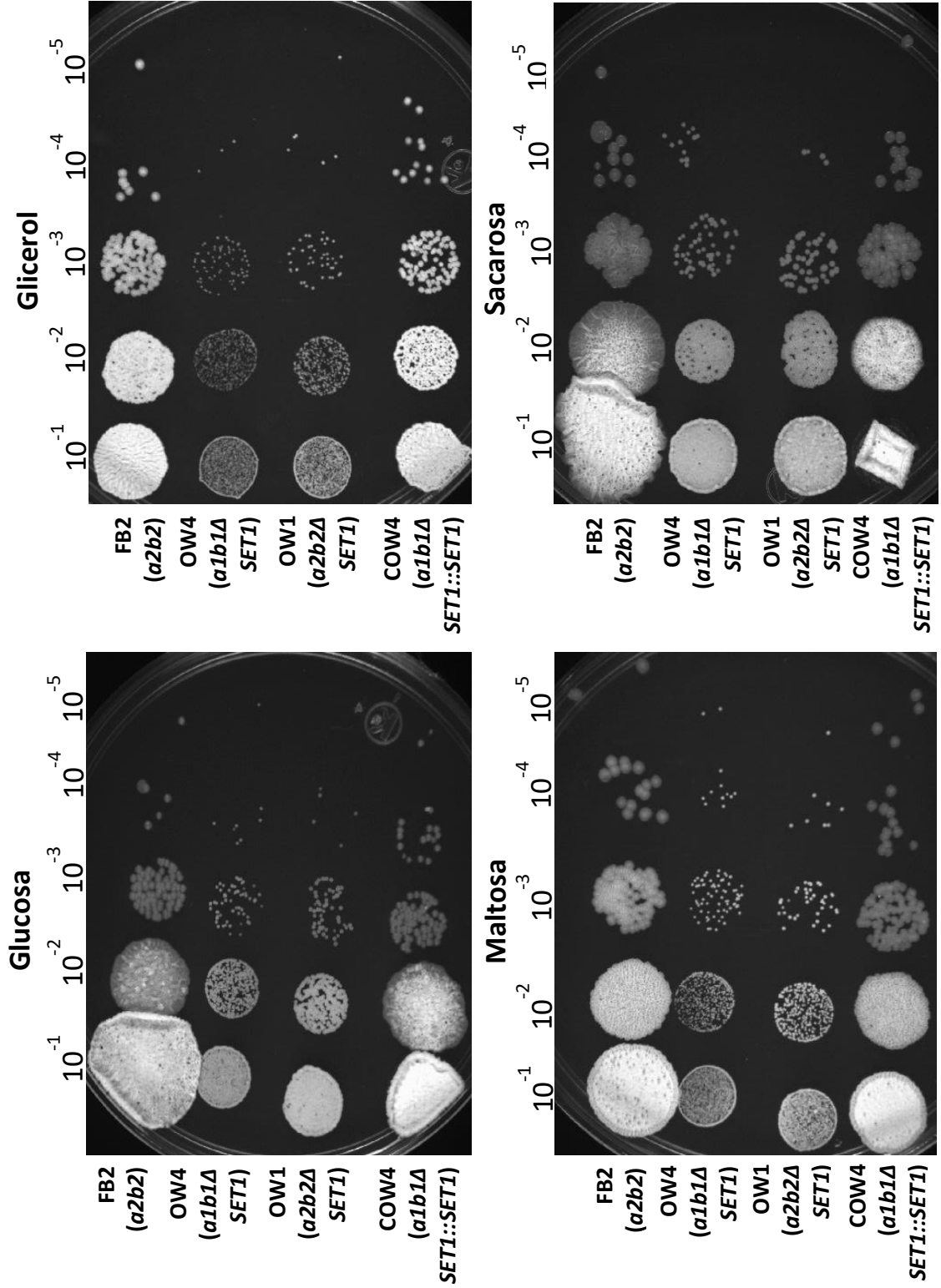


Figura 42. Resultados del ensayo de crecimiento en diversas fuentes de carbono para las cepas mutantes en *SET1*. Se llevaron a cabo 3 repeticiones.

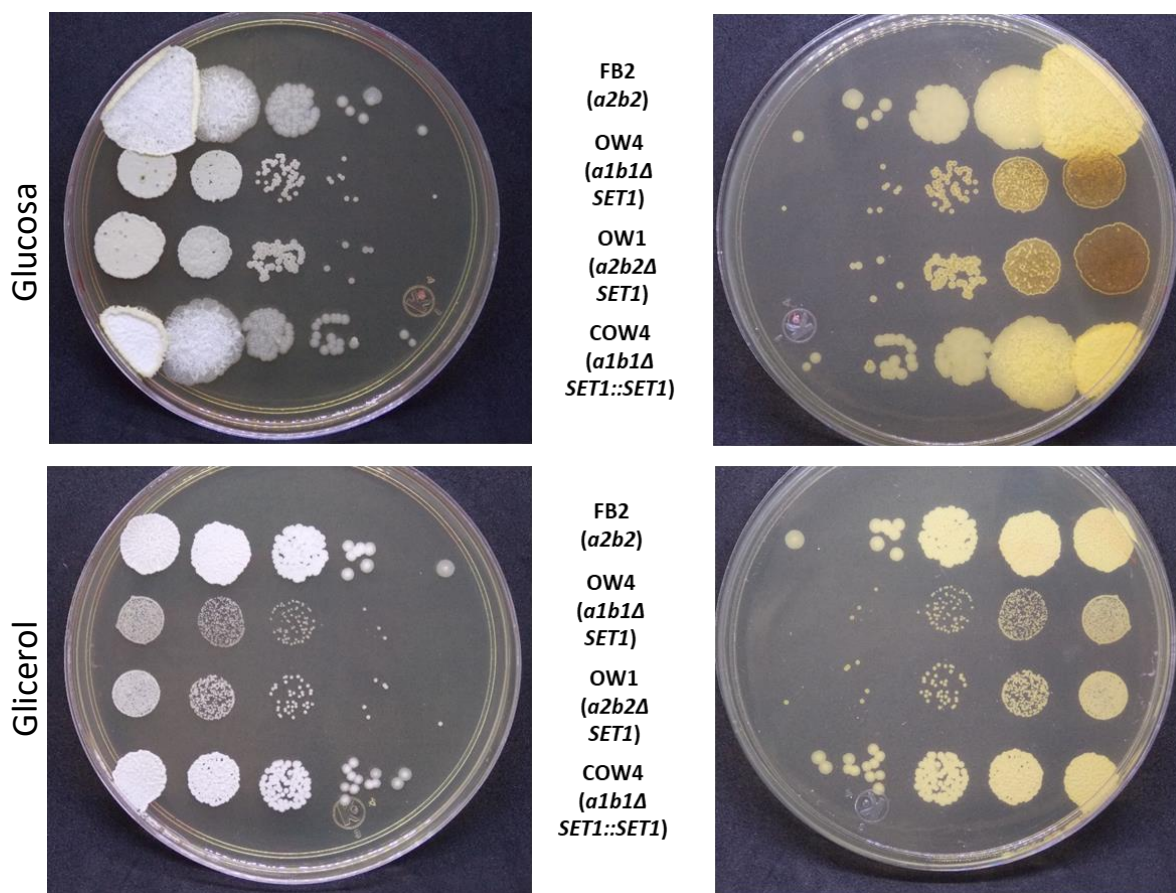


Figura 43. La síntesis del pigmento en las cepas mutantes para *set1* es dependiente de la fuente de carbono.

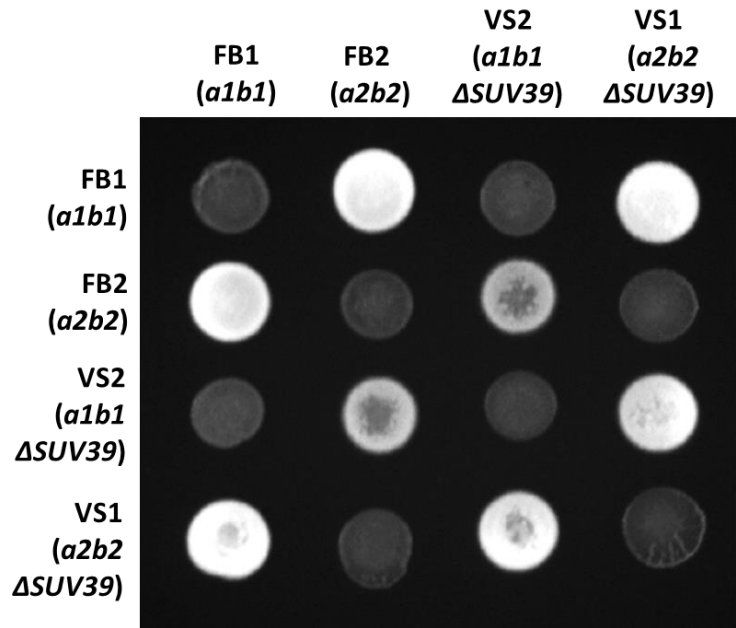
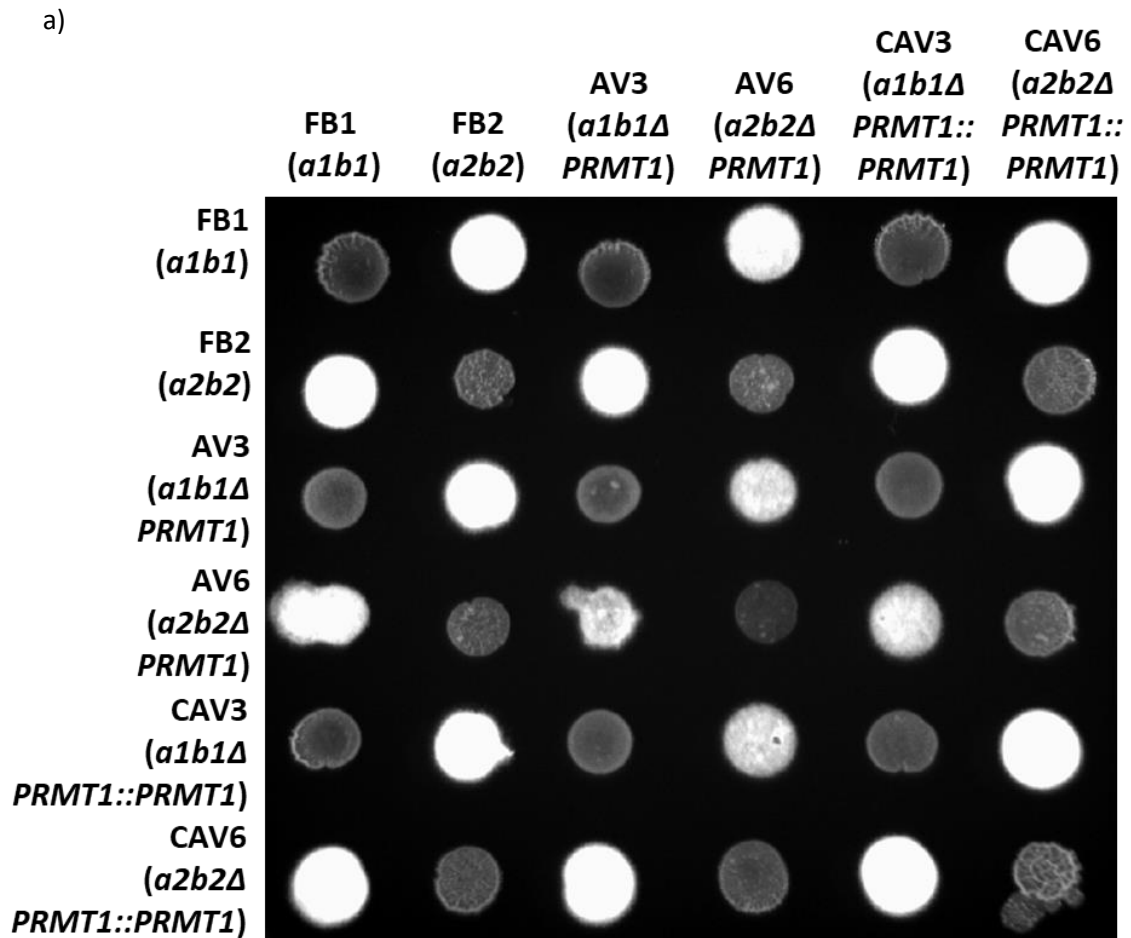


Figura 44. Resultados del ensayo de reacción Fuzz entre las cepas FB1 (*a1b1*) FB2 (*a2b2*), VS2 (*a1b1* Δ *SUV39*) y VS1 (*a2b2* Δ *SUV39*).



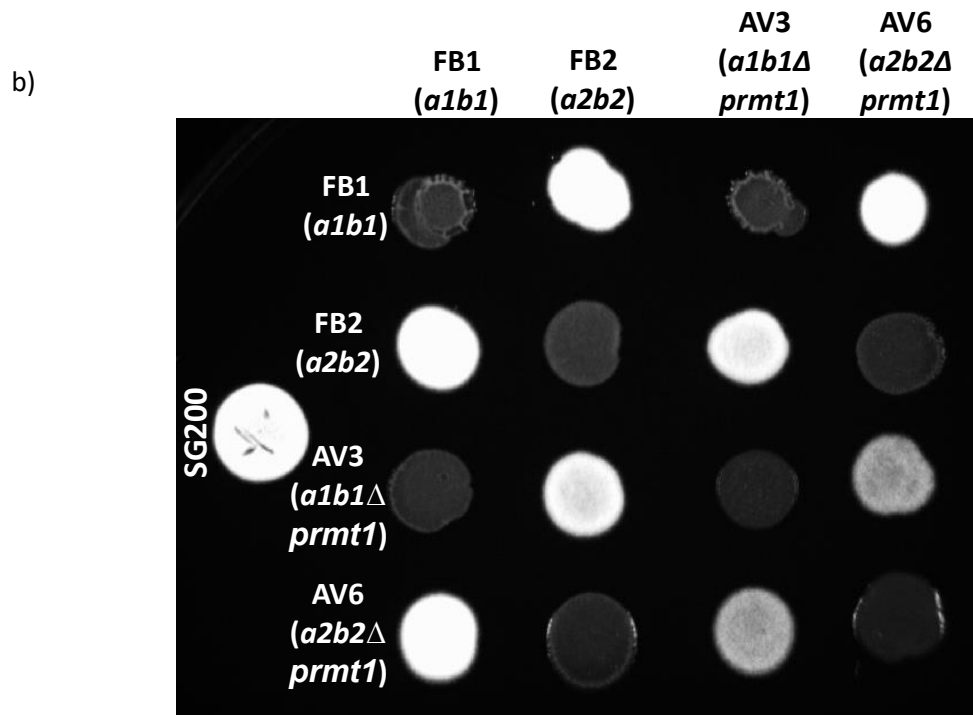


Figura 45. a y b) Resultados del ensayo de reacción Fuzz entre las cepas FB1 (*a1b1*) FB2 (*a2b2*), AV3 (*a1b1ΔPRMT1*), AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), CAV3 (*a1b1ΔPRMT1::PRMT1*), CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) y SG200.

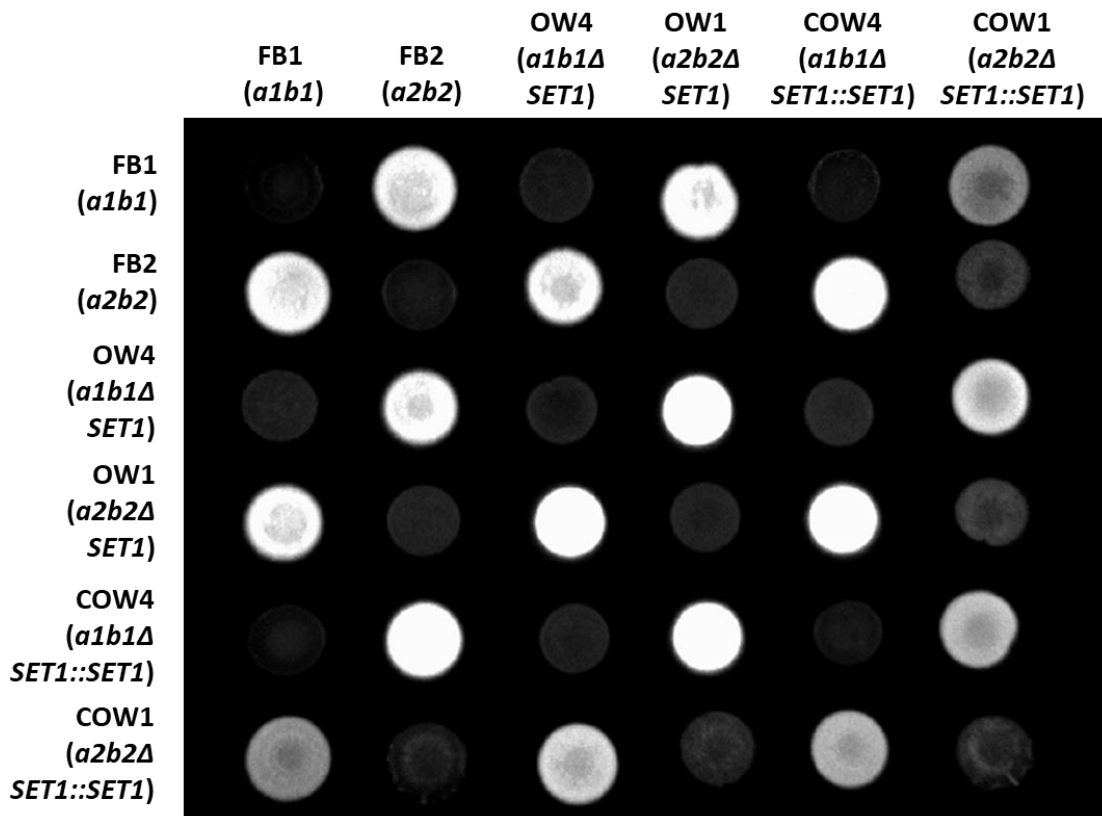


Figura 46. Resultados del ensayo de reacción Fuzz entre las cepas FB1 (*a1b1*) FB2 (*a2b2*), OW4 (*a1b1ΔSET1*), OW1 (*a2b2ΔSET1*), COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*), COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*).

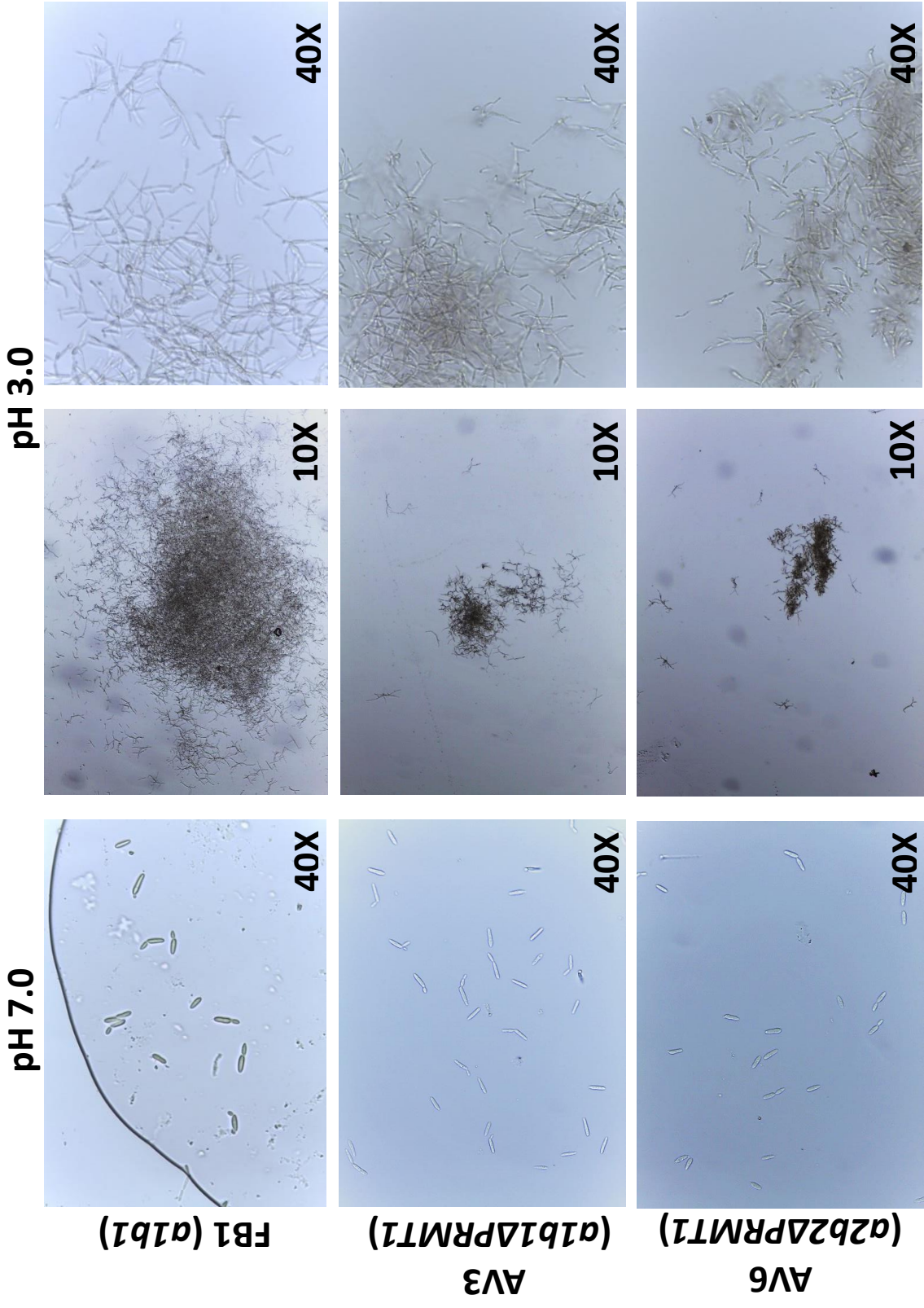


Figura 47a. Ensayo de transición dimórfica por pH. Parte 1.

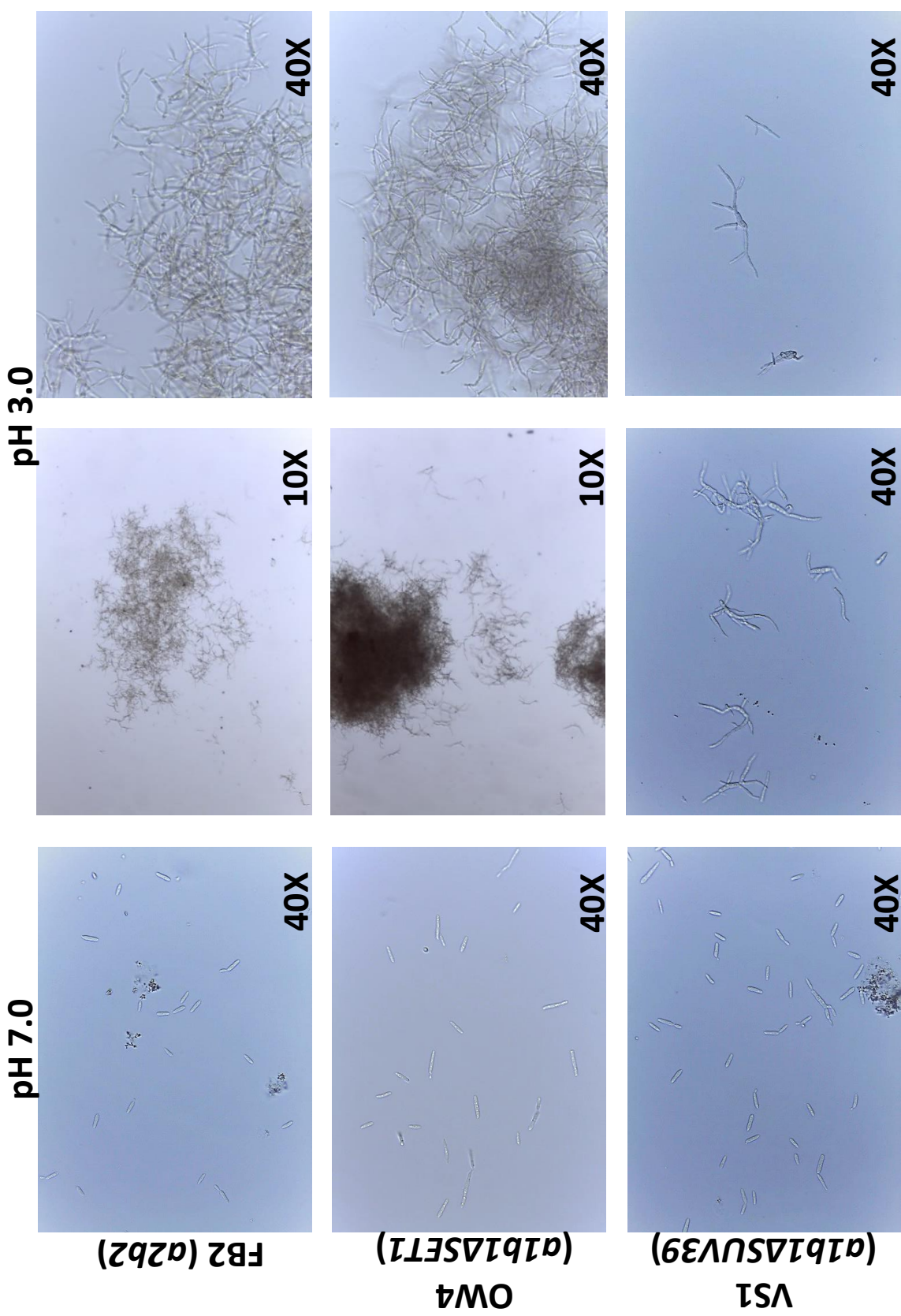


Figura 47b. Ensayo de transición dimórfica por pH. Parte 2.

7.3.5 Sensibilidad al estrés oxidativo

En las células el potencial redox se encuentra balanceado por sistemas encargados para tal fin. Si en el medio se presentan desviaciones de los valores que son normalmente tolerados por un tiempo prolongado, se habla de la presencia de estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede causar la muerte de las células, lo que se traduce en menor crecimiento (Breitenbach *et al.*, 2015). Los ensayos de susceptibilidad al estrés oxidativo en MC (Figura 48) revelaron que la cepa mutante VS2 (*alb1ΔSUV39*), presenta igual sensibilidad al estrés por H₂O₂ que la cepa FB1 (*alb1*) ($t = -0.280$, $p = 0.783$). No obstante, se encontraron diferencias significativas en sensibilidad entre las cepas FB1 (*alb1*), AV3 (*alb1ΔPRMT1*) y CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) ($F = 18.043$, $p = 0.000$), y las cepas FB1 (*alb1*), OW4 (*alb1ΔSET1*) y COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) ($F = 5.464$, $p = 0.011$). De acuerdo a la prueba de Tukey, la cepa mutante AV3 (*alb1ΔPRMT1*) es más sensible al H₂O₂ que la cepa silvestre. A su vez, la cepa CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) presenta menor sensibilidad al H₂O₂ que la cepa silvestre. De otra parte, la cepa OW4 (*alb1ΔSET1*) es más susceptible al estrés oxidativo que la cepa FB1 (*alb1*), mientras la cepa COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) muestra un fenotipo intermedio entre OW4 (*alb1ΔSET1*) y FB1 (*alb1*) (Cuadros 8 y 9, Figura 49).

7.3.6 Sensibilidad al Rojo Congo

El Rojo Congo es un colorante aniónico que perturba la pared celular fúngica. Como en el caso anterior, a mayor sensibilidad al compuesto, se registra un menor crecimiento del hongo. Al exponer las cepas mutantes a una concentración de 150 µg/ml de Rojo Congo, no se observó susceptibilidad incrementada en las cepas VS2 (*alb1ΔSUV39*) y VS1 (*a2b2ΔSUV39*), respecto al fenotipo silvestre. Sin embargo, las cepas AV3 (*alb1ΔPRMT1*), AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*), OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*), mostraron una notable reducción en su crecimiento. Este fenotipo se revierte con la re-introducción del gen silvestre en el caso de la cepa COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*), sin embargo, no ocurre lo mismo con la cepa CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) (Figura 50).

7.3.7 Sensibilidad al estrés osmótico

Se evaluó la sensibilidad de las cepas frente al estrés osmótico, empleando una concentración 1 M de KCl y NaCl. Se encontró que las cepas mutantes VS2 (*alb1ΔSUV39*), VS1 (*a2b2ΔSUV39*), AV3 (*alb1ΔPRMT1*) y AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), no se comportan de forma diferente a la cepa FB1 (*alb1*), cuando se encuentran bajo concentraciones altas de sal en el medio de cultivo (Figuras 51 y 52). Por su parte, el crecimiento de las cepas OW4 (*alb1ΔSET1*) y OW1 (*a2b2ΔSET1*), se vio notablemente afectado y fue casi nulo en el caso del medio con NaCl. Este fenotipo se revierte en la cepa complementada COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*) (Figura 53).

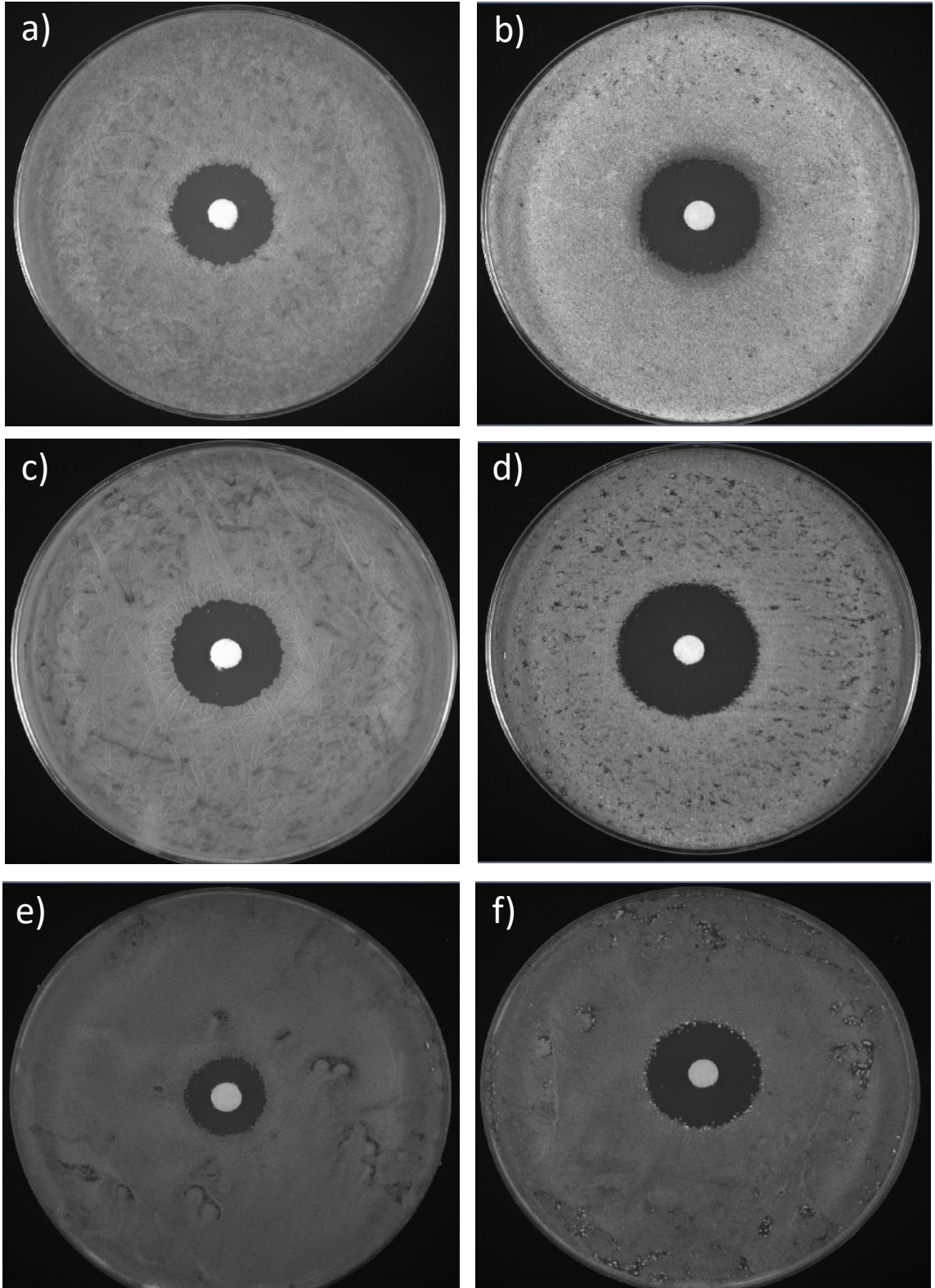


Figura 48. Resultados de las pruebas de resistencia al estrés oxidativo en MC. a) FB1 (*alb1*), b) AV3 (*alb1* Δ *PRMT1*), c) VS2 (*alb1* Δ *SUV39*), d) OW4 (*alb1* Δ *SET1*), e) CAV3 (*alb1* Δ *PRMT1::PRMT1*), f) COW4 (*alb1* Δ *SET1::SET1*).

Cuadro 9. Resultados de la prueba de Tukey para establecer diferencias entre la sensibilidad al H₂O₂ de las cepas FB1 (*alb1*), AV3 (*alb1ΔPRMT1*) y CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*).

| Cepa | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|-----------------------------------|----|------------------------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| CAV3 (<i>alb1ΔPRMT1::PRMT1</i>) | 6 | 1,9417 | | |
| FB1 (<i>alb1</i>) | 10 | | 2,2050 | |
| AV3 (<i>alb1ΔPRMT1</i>) | 10 | | | 2,4900 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Cuadro 10. Resultados de la prueba de Tukey para establecer diferencias entre la sensibilidad al H₂O₂ de las cepas FB1 (*alb1*), OW4 (*alb1ΔSET1*) y COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*).

| Cepa | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|---------------------------------|----|------------------------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| FB1 (<i>alb1</i>) | 10 | 2,2050 | |
| COW4 (<i>alb1ΔSET1::SET1</i>) | 6 | 2,4333 | 2,4333 |
| OW4 (<i>alb1ΔSET1</i>) | 10 | | 2,4850 |
| Sig. | | ,071 | ,858 |

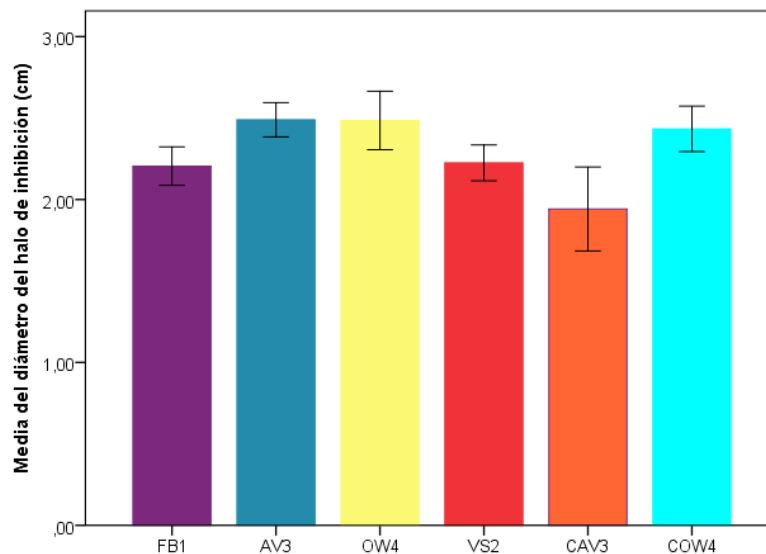


Figura 49. Diagrama de barras de error de la media del diámetro del halo de inhibición registrado por cepa. FB1 (*alb1*), AV3 (*alb1ΔPRMT1*), OW4 (*alb1ΔSET1*), VS2 (*alb1ΔSUV39*), CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) y COW4 (*alb1ΔSET1::SET1*). Barras de error: 95% IC.

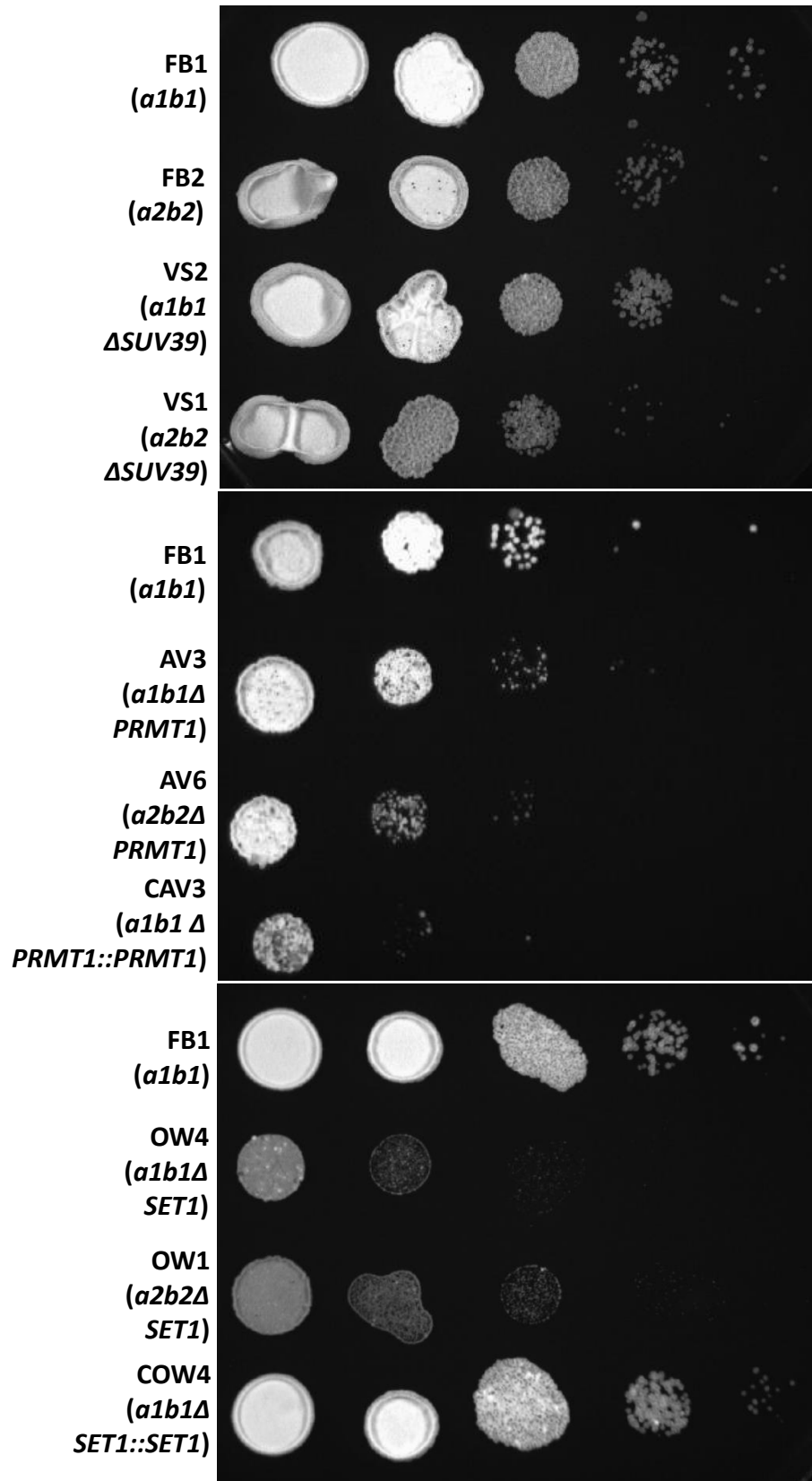


Figura 50. Resultados de la prueba de sensibilidad al Rojo Congo. Se realizaron 3 repeticiones.

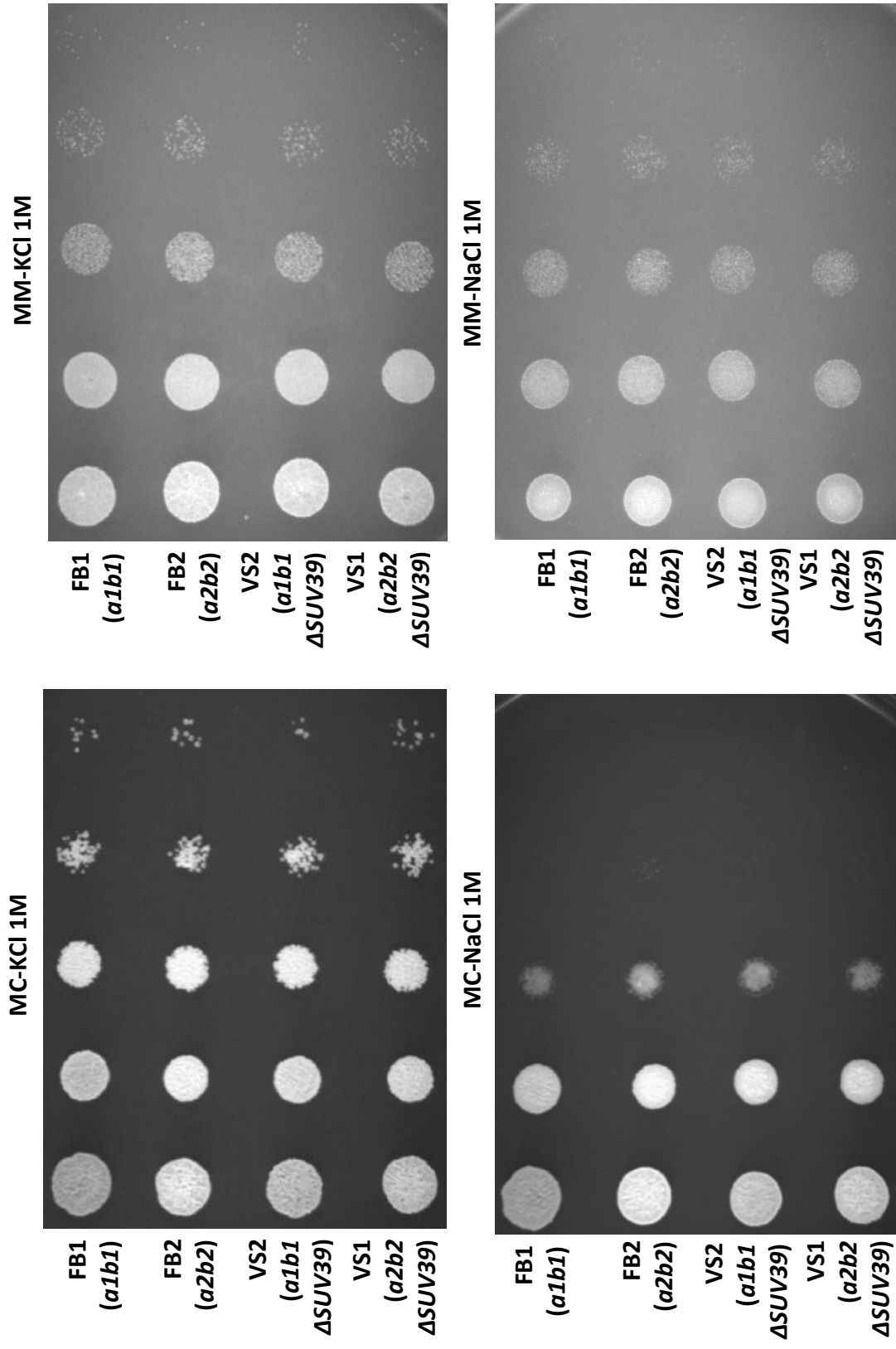


Figura 51. Resultados de las pruebas de sensibilidad al estrés oxidativo para las cepas mutantes en SUV39. Se realizaron 3 repeticiones.

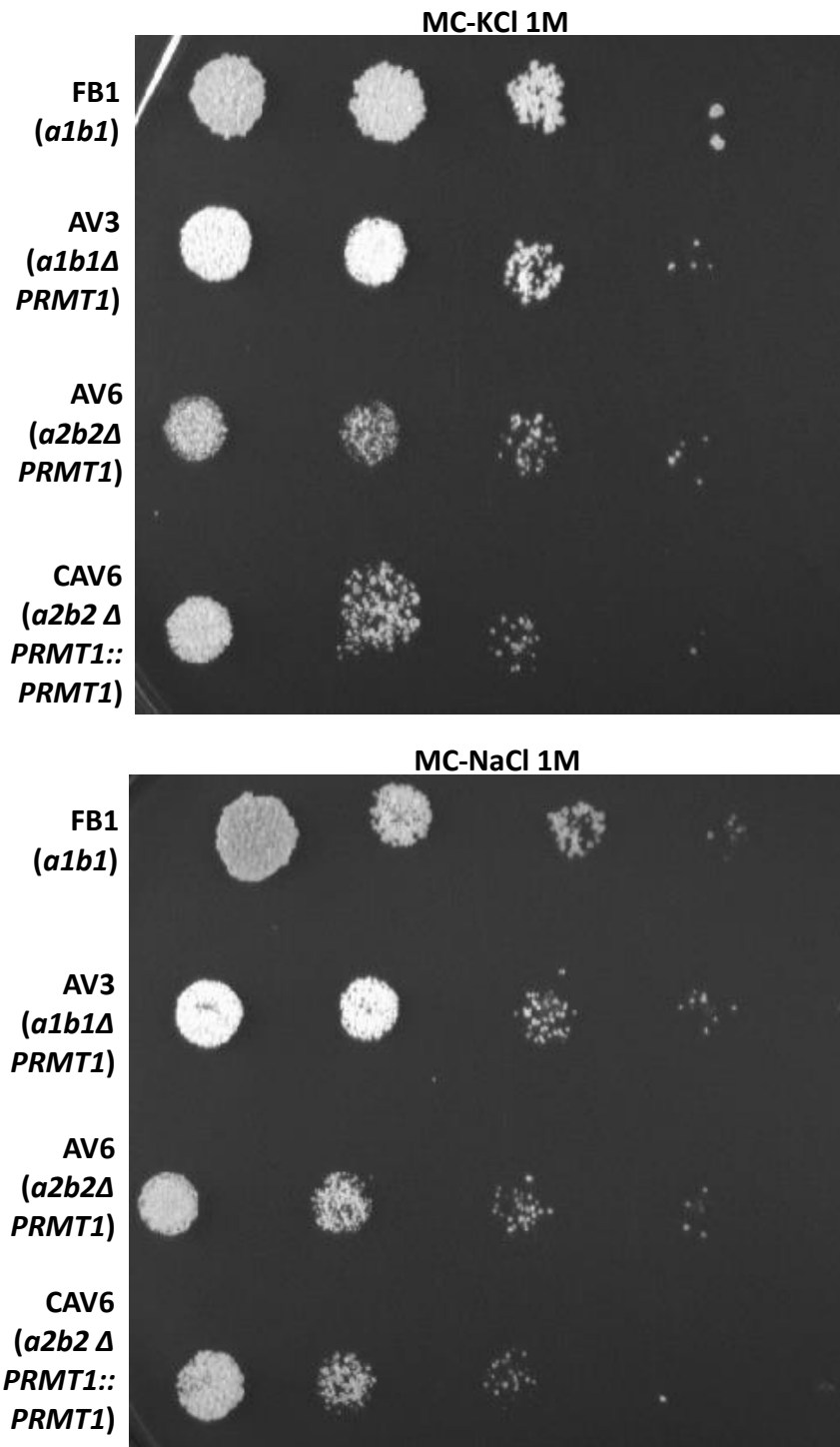


Figura 52. Resultados de las pruebas de sensibilidad al estrés oxidativo para las cepas mutantes en *PRMT1*. Se realizaron 3 repeticiones.

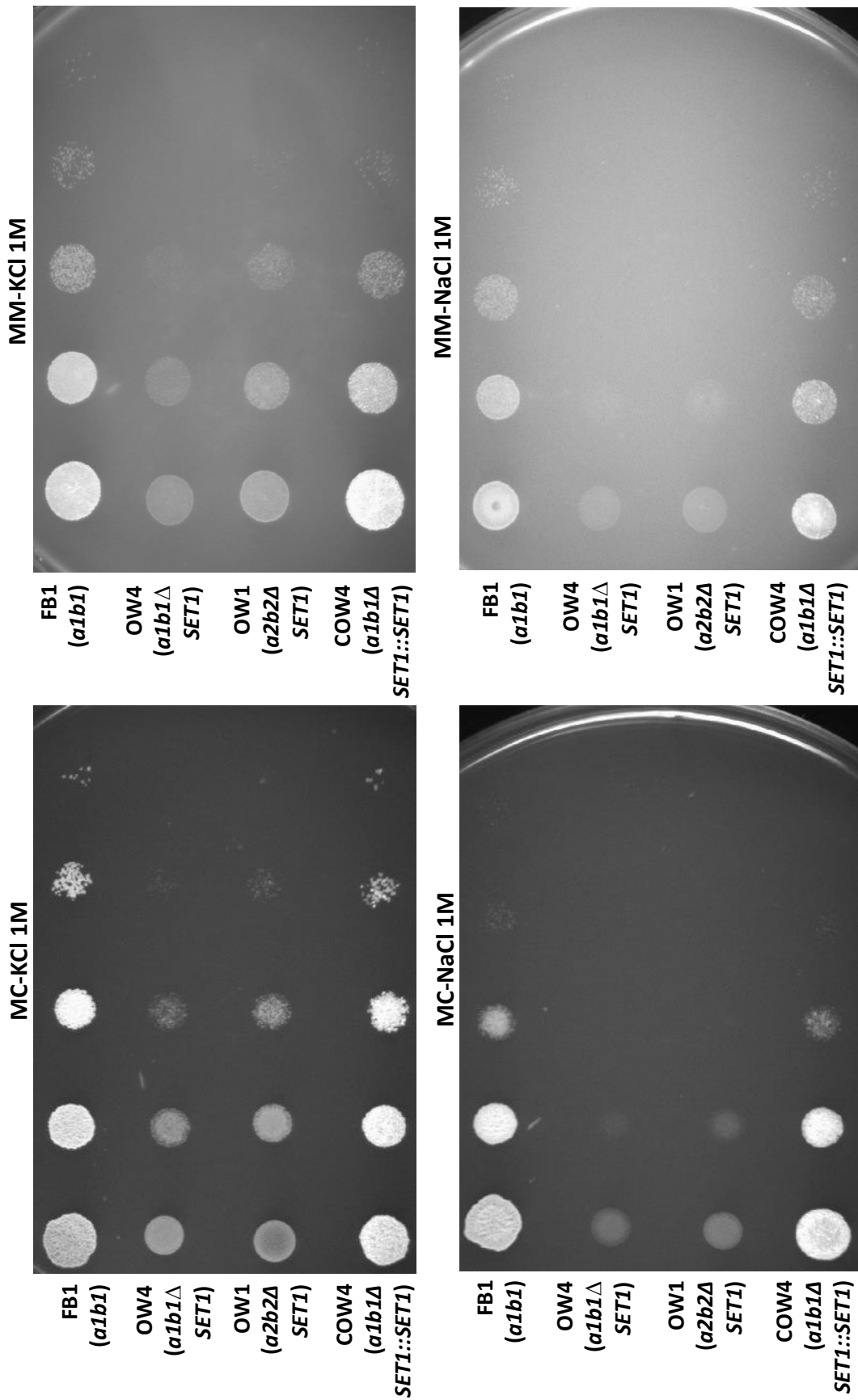


Figura 53. Resultados de las pruebas de sensibilidad al estrés oxidativo para las cepas mutantes en *SET1*. Se realizaron 3 repeticiones.

7.4 OBJETIVO 3

Determinar la participación del gen caracterizado en la virulencia de *U. maydis*.

Con el propósito de establecer si los genes interrumpidos están involucrados en la virulencia del hongo, se llevaron a cabo ensayos de patogenicidad en invernadero empleando plántulas de maíz de la variedad Golden Bantam. A continuación, se presentarán en conjunto los resultados de dos ensayos independientes. En el Cuadro 11 se encuentran los puntajes asignados de acuerdo a la escala de severidad empleada para evaluar los síntomas de la enfermedad, así como el índice de la enfermedad correspondiente. Al observar los índices de la enfermedad de los tratamientos FB1 (*alb1*) X FB2 (*a2b2*), VS2 (*alb1ΔSUV39*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*), FB1 (*alb1*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*), los valores registrados para la mezcla de cepas silvestres y la mezcla de mutantes, son prácticamente los mismos. El índice de la enfermedad de FB1 (*alb1*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*) es ligeramente menor. El diagrama de barras en la Figura 54 muestra un comportamiento muy similar de los síntomas registrados entre estos tres tratamientos. El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre estos tratamientos ($F= 1.213$, $p= 0.298$), lo que indica que la virulencia de estas cepas mutantes no está afectada.

Al comparar los índices de la enfermedad de los tratamientos FB1 (*alb1*) X FB2 (*a2b2*), AV3 (*alb1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), FB1 (*alb1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), FB1 (*alb1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) y CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*), el valor más alto registrado es el correspondiente a la mezcla de cepas silvestres. Con valores considerablemente menores se ubican los tratamientos AV3 (*alb1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) y FB1 (*alb1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), por lo cual se consideran menos agresivos. Finalmente, se encontró un valor notablemente bajo de índice de la enfermedad en la mezcla de CAV3 (*alb1ΔPRMT1::PRMT1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*), lo cual indica una marcada reducción en la virulencia (Cuadro 11). En el diagrama de barras se observa claramente cómo se incrementa el porcentaje de plantas sanas, disminuye el porcentaje de tumores grandes (> 1 cm) y desaparecen las



Figura 54. Escala de la severidad de los síntomas de la enfermedad empleada para la evaluación de los resultados de los ensayos de invernadero. Sin síntomas (0), clorosis y/o antocianinas (1), tumores pequeños (< 1 cm) (2), tumores grandes (> 1 cm) (3) y planta muerta (4).

Cuadro 11. Resultados de los ensayos de virulencia en invernadero.

| Tratamiento | No. de experimentos | Sin síntomas | | | | Clorosis y/o antocianinas | Tumores pequeños (<1 cm) | | Tumores grandes (>1cm) | Plantas muertas/marchitas | | Total | INDICE DE LA ENFERMEDAD |
|---|---------------------|--------------|----|----|-----|---------------------------|--------------------------|---|------------------------|---------------------------|-----|-------|-------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | 4 | 5 | | | | | |
| FB1 (a1b1) X FB2 (a2b2) | 2 | 37 | 45 | 75 | 86 | 5 | | | | | 248 | 1,91 | |
| AV3 (a1b1ΔPRMT1) X AV6 (a2b2ΔPRMT1) | 2 | 70 | 60 | 73 | 46 | 0 | | | | | 249 | 1,38 | |
| FB1 (a1b1) X AV6 (a2b2ΔPRMT1) | 1 | 43 | 19 | 34 | 6 | 0 | | | | | 102 | 1,03 | |
| FB1 (a1b1) X CAV6 (a2b2ΔPRMT1::PRMT1) | 1 | 41 | 15 | 21 | 22 | 2 | | | | | 101 | 1,30 | |
| CAV3 (a1b1ΔPRMT1::PRMT1) X CAV6 (a2b2ΔPRMT1::PRMT1) | 2 | 122 | 73 | 14 | 8 | 0 | | | | | 217 | 0,58 | |
| OW4 (a1b1ΔSET1) X OW1 (a2b2ΔSET1) | 2 | 49 | 50 | 64 | 92 | 0 | | | | | 255 | 1,78 | |
| FB1 (a1b1) X OW1 (a2b2ΔSET1) | 1 | 7 | 22 | 32 | 38 | 4 | | | | | 103 | 2,10 | |
| FB1 (a1b1) X COW1 (a2b2ΔSET1::SET1) | 1 | 37 | 48 | 13 | 0 | 0 | | | | | 98 | 0,76 | |
| COW4 (a1b1ΔSET1::SET1) X COW1 (a2b2ΔSET1::SET1) | 2 | 92 | 96 | 15 | 2 | 0 | | | | | 205 | 0,64 | |
| VS2 (a1b1ΔSUV39) X VS1 (a1b1ΔSUV39) | 2 | 49 | 41 | 72 | 107 | 5 | | | | | 274 | 1,92 | |
| FB1 (a1b1) X VS1 (a1b1ΔSUV39) | 2 | 64 | 46 | 60 | 101 | 6 | | | | | 277 | 1,78 | |
| Controles (agua) | 2 | 111 | | | | | | | | | 111 | | |

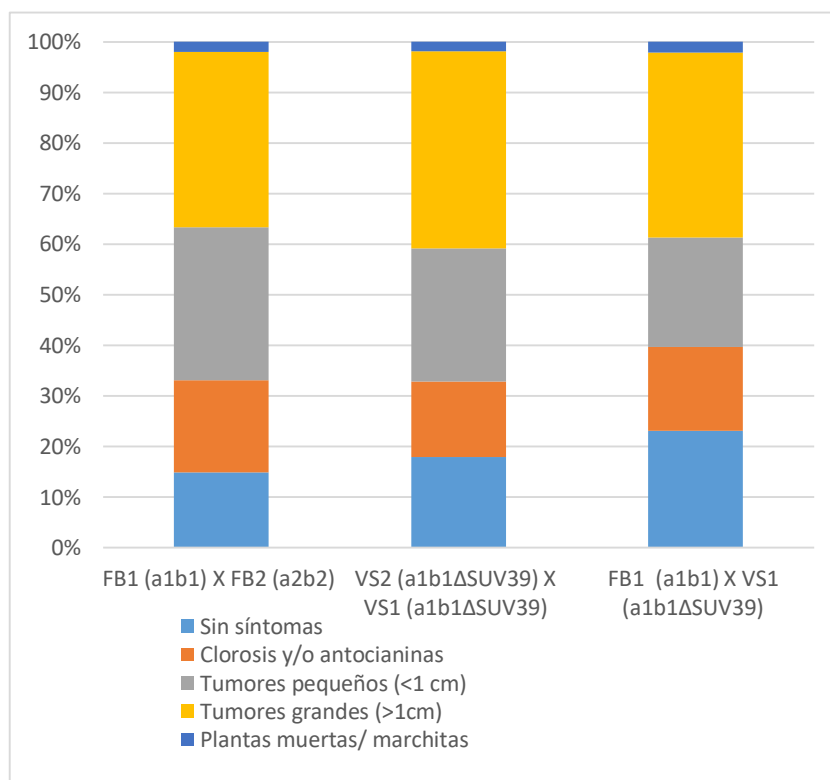


Figura 55. Cuantificación de los síntomas de la enfermedad por *U. maydis*, en las plantas que fueron infectadas con las mezclas de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), FB1 (*a1b1*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*).

plantas muertas y/o marchitas, en los tratamientos AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) y FB1 (*a1b1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*). En la mezcla de FB1 (*a1b1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) ocurre una ligera recuperación de la virulencia, representada por un incremento en las plantas con tumores grandes (> 1 cm) y la reaparición de las plantas muertas y/o marchitas. En concordancia con el índice de la enfermedad, el tratamiento CAV3 (*a1b1ΔPRMT1::PRMT1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) es el que muestra el mayor porcentaje de plantas sanas y con clorosis y/o antocianinas, así como el menor porcentaje con tumores pequeños (< 1 cm) y grandes (> 1 cm) (Figura 55). El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($K= 162.263$, $p= 0.000$), los cuales se agrupan como se observa en el Cuadro 12. La virulencia de AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) es significativamente menor a la de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*).

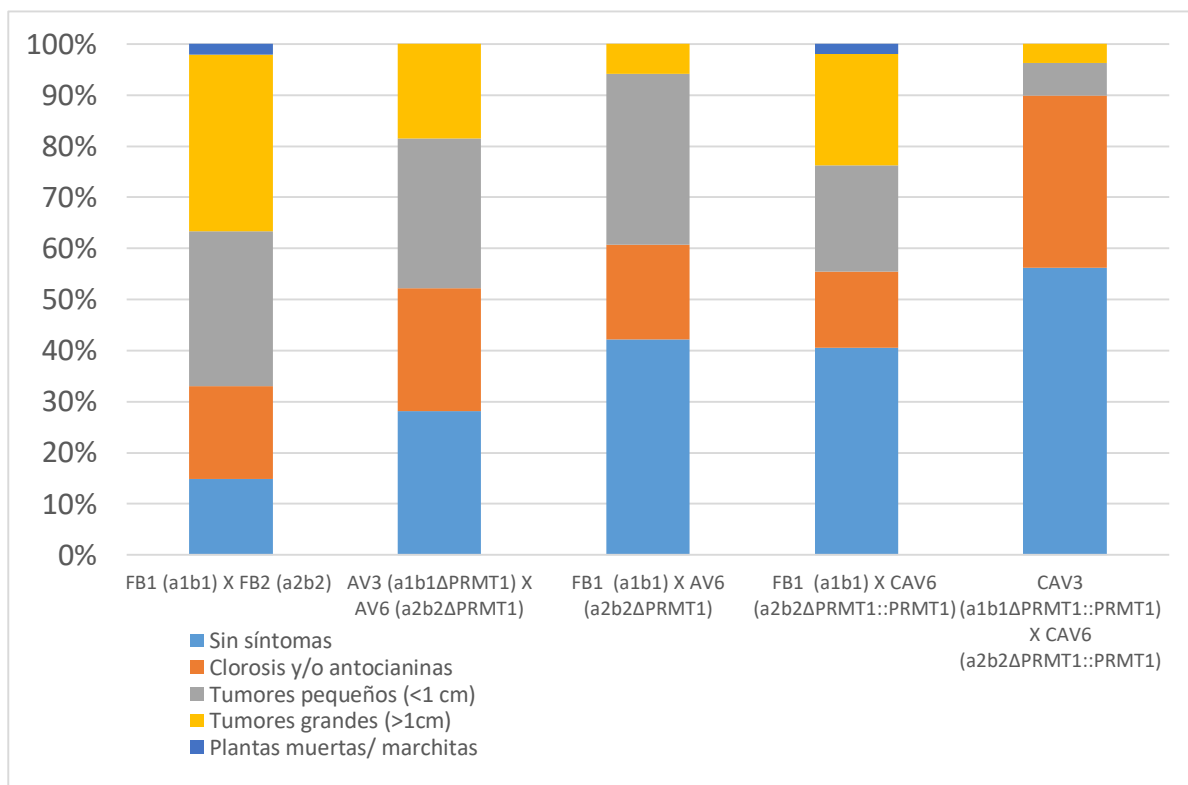


Figura 56. Cuantificación de los síntomas de la enfermedad por *U. maydis*, en las plantas que fueron infectadas con las mezclas de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), FB1 (*a1b1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), FB1 (*a1b1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) y CAV3 (*a1b1ΔPRMT1::PRMT1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*).

Cuadro 12. Resultados del análisis estadístico *post hoc*, para la determinación de diferencias en la virulencia entre las mezclas de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), FB1 (*a1b1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), FB1 (*a1b1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*) y CAV3 (*a1b1ΔPRMT1::PRMT1*) X CAV6 (*a2b2ΔPRMT1::PRMT1*).

| TRATAMIENTO | SUBCONJUNTO | | | |
|---|-------------|---------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| CAV3 (<i>a1b1ΔPRMT1::PRMT1</i>) X CAV6 (<i>a2b2ΔPRMT1::PRMT1</i>) | 300,763 | | | |
| FB1 (<i>a1b1</i>) X AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>) | | 404,279 | | |
| FB1 (<i>a1b1</i>) X CAV6 (<i>a2b2ΔPRMT1::PRMT1</i>) | | 455,985 | 455,985 | |
| AV3 (<i>a1b1ΔPRMT1</i>) X AV6 (<i>a2b2ΔPRMT1</i>) | | | 483,779 | |
| FB1 (<i>a1b1</i>) X FB2 (<i>a2b2</i>) | | | | 596,313 |

El nivel de significancia es 0,05

Respecto a los tratamientos FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*) y COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*), los tratamientos de mezclas de FB1 (*a1b1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*) y FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*) muestran los valores más altos de índice de la enfermedad, seguidos de cerca por OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*). Los índices más bajos corresponden a los tratamientos FB1 (*a1b1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*) y COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*), por lo cual son los menos virulentos (Cuadro 11). En el diagrama de barras el porcentaje de distribución de los síntomas es similar entre los tratamientos FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*) y FB1 (*a1b1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), mientras que en el tratamiento OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), se observa un porcentaje ligeramente mayor de plantas sanas, así como la ausencia de plantas muertas y/o marchitas (Figura 56).

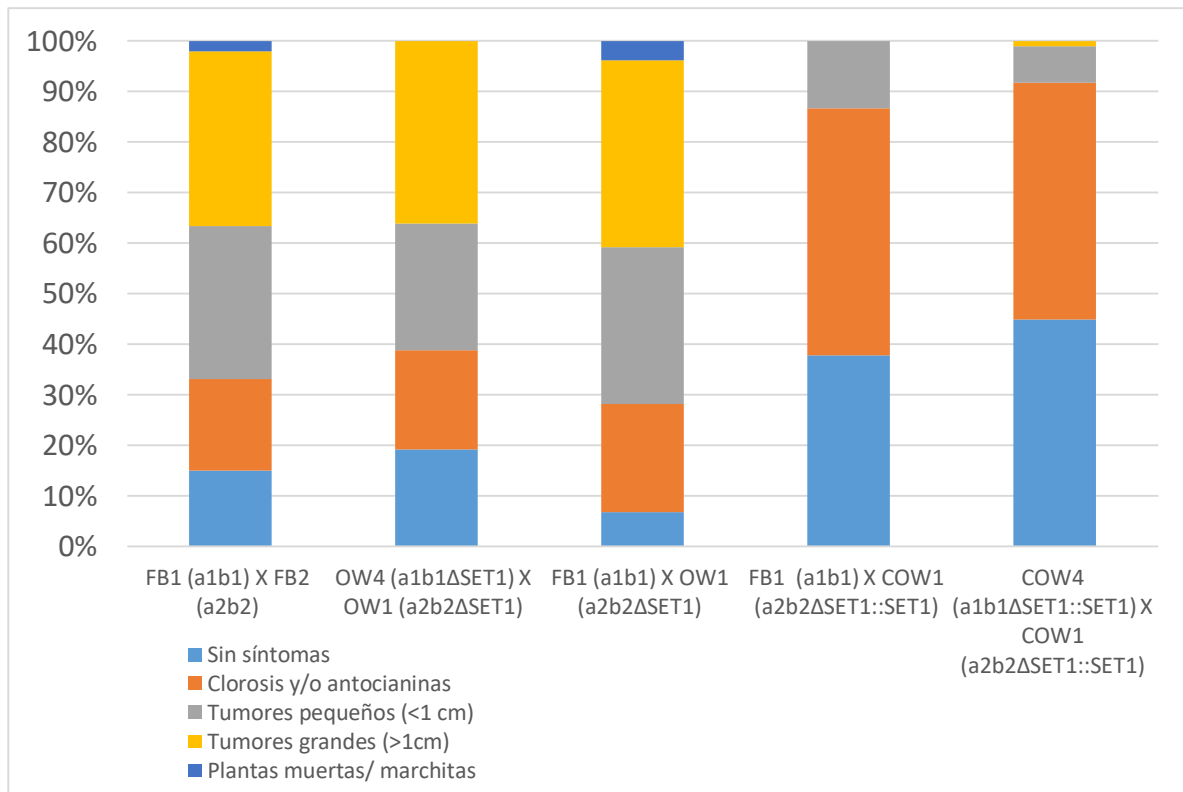


Figura 57. Cuantificación de los síntomas de la enfermedad por *U. maydis*, en las plantas que fueron infectadas con las mezclas de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*) y COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*).

Nuevamente, la distribución de los síntomas entre FB1 (*a1b1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*) y COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*), es similar. Son los tratamientos con mayores porcentajes de plantas sanas y con clorosis y/o antocianinas. El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($K= 235.366$, $p= 0.000$), y estos se agrupan de acuerdo a lo observado en el Cuadro 13. No existen diferencias entre la virulencia de los tratamientos FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*) y OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*).

Cuadro 13. Resultados del análisis estadístico *post hoc*, para la determinación de diferencias en la virulencia entre las mezclas de FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), FB1 (*a1b1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*) y COW4 (*a1b1ΔSET1::SET1*) X COW1 (*a2b2ΔSET1::SET1*).

| TRATAMIENTO | SUBCONJUNTO | |
|---|-------------|---------|
| | 1 | 2 |
| COW4 (<i>a1b1ΔSET1::SET1</i>) X COW1 (<i>a2b2ΔSET1::SET1</i>) | 265,768 | |
| FB1 (<i>a1b1</i>) X COW1 (<i>a2b2ΔSET1::SET1</i>) | 292,398 | |
| OW4 (<i>a1b1ΔSET1</i>) X OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>) | | 522,529 |
| FB1 (<i>a1b1</i>) X FB2 (<i>a2b2</i>) | | 550,04 |
| FB1 (<i>a1b1</i>) X OW1 (<i>a2b2ΔSET1</i>) | | 589,573 |
| El nivel de significancia es 0,05 | | |

En la Figura 58 se encuentra el comparativo entre los tumores grandes de las hojas para algunos de los tratamientos, al término de los ensayos de virulencia. Como puede observarse, al final de las pruebas de patogenicidad, los tumores obtenidos en la mezcla de cepas silvestres ya han empezado su maduración. Esta se aprecia por el ennegrecimiento de los tumores generados, señal de que se han formado las teliosporas. Respecto a los tumores generados por la mezcla de OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), la mayoría de estos aún se encuentran inmaduros (> 90%) y evidencian una producción alta de antocianinas. De igual manera, al término de la prueba, los tumores formados a partir de la mezcla de AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*) están aún inmaduros (> 95%) y se observan blancos o de color crema. Los tumores producidos a

partir de VS2 (*a1b1ΔSUV39*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*) son los que se muestran en su mayoría más oscuros, por lo que se infiere son los que alcanzaron un mayor grado de maduración.



Figura 58. Comparación de los tumores generados en las hojas de las plantas de maíz. a) Control, b) FB1 (*a1b1*) X FB2 (*a2b2*), c) OW4 (*a1b1ΔSET1*) X OW1 (*a2b2ΔSET1*), d) AV3 (*a1b1ΔPRMT1*) X AV6 (*a2b2ΔPRMT1*), e) VS2 (*a1b1ΔSUV39*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*).

Es notorio que, a diferencia de lo que se observa en los otros tratamientos, los tumores de VS2 (*a1b1ΔSUV39*) X VS1 (*a2b2ΔSUV39*) se forman fundamentalmente en la vena principal de la hoja, de forma compacta. Lo anterior, podría indicar que la mutación de *SUV39* altera la capacidad de dispersión del hongo en la hoja.

8 DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, la epigenética se ha consolidado como la primera línea de investigación que se emplea para la explicación de una gran variedad de fenómenos biológicos, desde la base de las patologías humanas y de la virulencia de los patógenos causantes de algunas de estas enfermedades; hasta las alteraciones del sistema inmune de las plantas inducidas por patógenos, la producción de metabolitos secundarios en los microorganismos, la herencia transgeneracional de características adquiridas por influencia ambiental, la evolución y la variabilidad fenotípica de los organismos, entre muchos otros. Para esto, el estudio de la epigenética ha requerido de buenos modelos experimentales, entre los más reconocidos se encuentran *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, y por supuesto, los hongos (Allis *et al.*, 2007; Dubey y Jeon, 2017).

En general, los hongos han sido modelos muy informativos en el estudio de eventos epigenéticos, debido a que son organismos relativamente sencillos, sus mecanismos epigenéticos se conservan a lo largo de los eucariotas, poseen genomas pequeños carentes de cantidades altas de repeticiones, y son amigables para su manipulación y modificación en el laboratorio. Hasta el momento, la mayoría de los trabajos en modelos fúngicos se han centrado en el estudio de hongos no patogénicos tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *N. crassa*, los cuales han aportado valiosos conocimientos sobre los principales mecanismos de regulación epigenética, así como de los mecanismos de regulación epigenética alternativos exclusivos de los hongos. No obstante, el número de trabajos relacionados con las bases epigenéticas del proceso patogénico de los hongos que atacan a las plantas, o con la modulación epigenética del crecimiento y la patogenicidad de los fitopatógenos fúngicos, aún es muy pobre (Dubey y Jeon, 2017; Smith *et al.*, 2012).

Los hongos fitopatógenos son organismos relevantes, no solamente por la severidad de las enfermedades que producen y las pérdidas económicas asociadas, sino por la diversidad de estrategias que han desarrollado para colonizar a las plantas. Estas

estrategias involucran transiciones morfológicas, la síntesis de estructuras patogénicas, la producción de factores de virulencia y el despliegue de mecanismos de adaptación; sucesos que, en su conjunto, constituyen eventos de diferenciación celular y desarrollo. La especialización de las células de los organismos eucariotas se encuentra bajo regulación epigenética. Es por lo anterior que, para la comprensión total de este tipo de organismos, se requiere no solo del conocimiento de sus mecanismos de virulencia, evolución y adaptación, sino también del rol que tiene la epigenética en cada uno de estos aspectos de los fitopatógenos fúngicos (Doehlemann *et al.*, 2017; Dubey y Jeon, 2017).

U. maydis es uno de los organismos modelo más empleados en la actualidad para la investigación de procesos muy diversos, y es considerado uno de los 10 fitopatógenos fúngicos más importantes desde el punto de vista científico-económico, a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012). Como se ha visto, *U. maydis* es un basidiomiceto que se propaga fácilmente en medios definidos, posee una fase de crecimiento haploide levaduriforme que forma colonias compactas y que, en mezcla con células haploides sexualmente compatibles, puede infectar plántulas de maíz. Los síntomas de la enfermedad se observan luego de los primeros 6 días de infección y el ciclo de vida del hongo se completa después de 15 días. Para que esto suceda, el hongo atraviesa por una fase dicarionte filamentosa, para finalmente formar tumores repletos de esporas diploides, que, al germinar, dan origen a cuatro células haploides. *U. maydis* posee un sistema de recombinación homóloga remarcablemente eficiente, que ha facilitado el desarrollo de una considerable cantidad de herramientas moleculares para su investigación. Adicionalmente, se ha demostrado que *U. maydis* está relacionado de forma más cercana con los humanos que con las levaduras, y que existen muchas proteínas que son compartidas únicamente entre *U. maydis* y el *H. sapiens*. Estas y muchas otras características han hecho de *U. maydis* un modelo muy interesante y práctico para su estudio (Dean *et al.*, 2012).

A nivel epigenético, *U. maydis* se caracteriza por no poseer la maquinaria necesaria para metilar el DNA, llevar acabo el silenciamiento génico a través de iRNA, o mecanismos como RIP. No obstante, como en el caso de la mayoría de los patógenos fúngicos de plantas, existen pocos trabajos relacionados con su epigenética. Nosotros decidimos indagar a cerca de la relación que existe entre algunos genes que codifican para proteínas

que participan de la remodelación de la cromatina y la virulencia de *U. maydis*. Para esto, primero identificamos en el hongo los genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas y el regulador transcripcional Sin3. Las metiltransferasas de histonas son enzimas escritoras del código epigenético, altamente conservadas, que catalizan la transferencia de grupos metilo provenientes del donador SAM, a las terminaciones de las histonas, para señalar la activación o la represión de los genes. Existen dos grupos de metiltransferasas de histona: de lisina (HKMTs) y de arginina (PRMTs). Estas enzimas se han relacionado con procesos de señalización, control del ciclo celular, proliferación, apoptosis, metabolismo secundario, desarrollo y virulencia, en eucariotas. Por su parte, el co-represor Sin3 es una proteína andamio que hace parte de diferentes complejos de desacetilasas de histonas. Debido a lo anterior, Sin3 se encuentra asociado principalmente a la represión de la cromatina. Sin3 es una proteína altamente conservada, desde las levaduras, hasta los mamíferos, que está involucrada en procesos como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, senescencia, regulación de rutas metabólicas y del ciclo celular (Grzenda *et al.*, 2009; Kadamb *et al.*, 2013; Laurie *et al.*, 2012; Laurie *et al.*, 2013; Pham *et al.*, 2015).

La búsqueda en el genoma de *U. maydis* nos permitió la identificación de 10 genes que codifican para proteínas metiltransferasas de histonas, y de un gen que codifica para el regulador transcripcional Sin3. Dentro de las enzimas metiltransferasas de histonas, 6 corresponden a HKMTs y 4 a PRMTs. Comúnmente, las HKMTs se agrupan en dos grandes familias, las proteínas que poseen dominio SET y las que tiene dominio DOT1. Sin embargo, no existe disponible una clasificación más detallada para los eucariotas, o que organice las HKMTs fúngicas hasta ahora reportadas. Murcia-Garzón (2016) propone a partir de su clasificación molecular de HKMTs en eucariotas, que existen 7 subfamilias denominadas SET1, SET2, SET7, SETD8, SUV39, SUV40 y EZ. Las subfamilias que encontramos en este estudio son Suv39/KMT1, Set9/KMT5, Set2/KMT3, Ash/KMTH2, Set1/KMT2, Ezh/KMT6, Set6/AshR y Dot1/KMT4, en concordancia a lo reportado en *M. oryzae* por Pham *et al.* (2015). Al parecer, las subfamilias SET7 y SETD8 no tienen representantes en los hongos, y la subfamilia SUV40 es equivalente a la subfamilia Set9 (Veerappan *et al.*, 2008).

Como era de esperarse, en este trabajo la mayoría de subfamilias con dominio SET se agruparon en un clado único, con excepción de las proteínas de la subfamilia Set6/AshR, las cuales sorprendentemente comparten clado con las proteínas que no poseen dominio SET (DOT1). La posible función de Set6 aún no ha sido definida. En *U. maydis* no se encuentran miembros de la subfamilia Set6/AshR, lo mismo ocurre con las subfamilias Ezh/KMT6 y Ash/KMTH2. Freitag (2017) reportó la ausencia de la metilación de H3K27 en *U. maydis*, modificación que está asociada con las enzimas Ezh/KMT6. Se ha encontrado que la pérdida de la facultad de metilar tanto el DNA, como H3K27, es un evento frecuente en los hongos. Es el caso de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus oryzae*, *Allomyces macrogynus* y *Batrachochytrium dendrobatidis*, entre otros. A pesar de que parece existir una relación obvia entre estas dos modificaciones represoras de la transcripción (5mC y H3K27), esta no ha sido aún caracterizada apropiadamente (Rose y Klose, 2014). Por su parte, la ausencia de proteínas de la subfamilia Ash/KMTH2, involucrada en la metilación de H3K36, puede ser suplida en *U. maydis* por las proteínas de la subfamilia Set2/KMT3. Veerappan *et al.* (2008) proponen que Ash/KMTH2 y Set2/KMT3 conforman una familia única, y los resultados de nuestra filogenia señalan que estas subfamilias son muy cercanas entre sí. De acuerdo a estos resultados, *U. maydis* tiene la capacidad de metilar las posiciones H3K4, H3K9, H3K36, H3K79 y H4K20.

Respecto a la reconstrucción filogenética de PRMTs, *U. maydis* posee miembros en las cuatro subfamilias hasta ahora reportadas en los hongos, por lo que potencialmente puede llevar a cabo las marcas que han sido descritas para estas proteínas. Las subfamilias Prmt1, Prmt3 y Prmt4/CARM1 (PRMTs tipo I), comparten un ancestro común, mientras la subfamilia Prmt5 (PRMT tipo 2), se localiza en un clado diferente. Prmt1 y Prmt4 están asociadas a la activación de la transcripción, mientras Prmt5, al silenciamiento génico. La subfamilia Prmt4 está ausente por completo en ascomicetos filamentosos, y la función de Prmt3 es desconocida (Brosch *et al.*, 2008). Finalmente, el árbol filogenético de Sin3 evidencia que esta proteína en *U. maydis* es, como era de esperarse, cercana a otras proteínas homólogas de los basidiomicetos. A diferencia de lo que ocurre en otros organismos como *S. pombe*, *A. thaliana* y *H. sapiens*, en el genoma de *U. maydis* solo

existe un gen que codifica para esta proteína. En todos los casos, las filogenias nos permitieron corroborar la identidad de las secuencias de trabajo.

Después de la elaboración de las construcciones de interrupción de varios de los genes que codifican para metiltransferasas de histonas y Sin3 en *U. maydis*, se obtuvieron mutantes para los genes *SUV39*, *SET1* y *PRMT1*, en los sexos *a1b1* y *a2b2*. Inicialmente se consideró que los ensayos de Southern blot para la identificación de mutantes del gen *SIN3* no fueron exitosos, debido a la presencia de una doble señal tanto en el DNA silvestre, como transformante. Sin embargo, se demostró que la sonda empleada hibridaba tanto con el gen de estudio, como con el inmediatamente adyacente en el genoma (cromosoma 6), situación que es la causa de la doble señal. Teniendo en cuenta esta circunstancia, y que en las cepas transformantes se obtiene consistentemente señal al tamaño esperado que indica la presencia de la mutación, se considera que las cepas transformantes evaluadas en realidad corresponden a cepas $\Delta SIN3$. Para obtener señal única, se requiere del diseño de una nueva sonda. Un ensayo de PCR del marco de lectura abierto de *SIN3* también sería útil para demostrar la ausencia del gen. Debido a la interpretación inicial errada (inserciones ectópicas del casete de interrupción), no se procedió al análisis de estas cepas.

De las proteínas correspondientes a los genes *SUV39*, *SET1* y *PRMT1*, la metiltransferasa de arginina Prmt1, demostró que se requiere para la virulencia completa de *U. maydis* en la planta de maíz. La mezcla de mutantes AV3 (*a1b1* $\Delta PRMT1$) X AV6 (*a2b2* $\Delta PRMT1$) generó un incremento del 13.2% en las plantas sanas, del 6% en plantas con clorosis y/o antocianinas y una reducción del 16.2 % en plantas con tumores grandes (> 1 cm), con respecto a la mezcla de cepas silvestres. La virulencia no se recupera al mezclar FB1 (*a1b1*) X AV6 (*a2b2* $\Delta PRMT1$) (silvestre y mutante). Al término de los ensayos de invernadero, los tumores generados por la mezcla de mutantes evidenciaron retraso en su maduración. La ausencia de Prmt1 además ocasiona alteraciones ligeras en la morfología colonial, susceptibilidad aumentada frente a temperaturas de crecimiento bajas y altas, sensibilidad incrementada a la exposición a H₂O₂ y al Rojo Congo, y una ligera alteración en la capacidad de apareamiento entre las cepas mutantes de ambos sexos.

A pesar de que Prmt1 es una proteína altamente conservada a lo largo de los hongos, sus funciones no han sido caracterizadas experimentalmente en los hongos que atacan a las plantas. Existe un único reporte de la participación de esta proteína en el proceso patogénico de un fitopatógeno fúngico. Es el caso de *F. graminearum*, un ascomiceto conocido por ser el principal agente causal del tizón de la cebada, el trigo y otros cereales. En *F. graminearum*, la interrupción de *AMT1* (*PRMT1*) ocasiona defectos en el crecimiento del hongo y la infección de las plantas. Adicionalmente, la cepa mutante exhibe sensibilidad incrementada al H₂O₂, al SDS, y la reducción de la producción del factor de virulencia DON. Se considera que en su conjunto, todos estos defectos contribuyen a la disminución de la virulencia de *F. graminearum* en la planta de maíz (Wang *et al.*, 2012). De forma similar a la mutación de *AMT1*, la mutación de *PRMT1* en *U. maydis* ocasiona reducción de la virulencia, y aumento de la sensibilidad al H₂O₂ y a agentes que generan estrés en la membrana celular. La capacidad para enfrentarse a condiciones de estrés hiperosmótico en ambos casos está intacta, por lo que *AMT1* y *PRMT1* son dispensables para este tipo de respuestas. En *A. nidulans*, la interrupción de *rmtA* (*PRMT1*) genera igualmente la reducción del crecimiento del hongo ante condiciones de estrés oxidativo (Bauer *et al.*, 2010).

Uno de los primeros mecanismos de defensa que poseen las plantas frente al ataque de agentes patógenos es la “explosión oxidativa”, la cual consiste en una producción alta y localizada (en el sitio de penetración) de especies reactivas de oxígeno (ROS) (H₂O₂, O₂⁻, O₂, OH⁻), con el propósito de controlar e inhibir el crecimiento de los patógenos. Además de ser agentes antimicrobianos, ROS actúan como mensajeros secundarios locales y sistémicos que desencadenan otras respuestas del sistema inmune de las plantas (Camejo *et al.*, 2016). En *U. maydis*, la ausencia de Pep1, una proteína que inhibe la peroxidasa del maíz y por lo tanto la “explosión oxidativa”; provoca una fuerte respuesta de la planta, la acumulación de H₂O₂ y la detención del proceso invasivo del hongo en la etapa de penetración epidermal (Hemetsberger *et al.*, 2012). De igual forma, la mutación del gen que codifica para el factor de transcripción Yap1p, ocasiona el incremento de la sensibilidad del hongo al H₂O₂ y la reducción de su virulencia. Existe un incremento en la acumulación de H₂O₂, alrededor de la hifa de la cepa mutante. Yap1p actúa como un sensor redox para la detoxificación de ROS, regulando la expresión de genes que se

requieren para tal fin (Molina y Kahmann, 2007). Estas son evidencias de que el incremento de la sensibilidad al H₂O₂ observado por la interrupción de *PRMT1* en *U. maydis*, puede ser una de las causas de la reducción de su virulencia. Prmt1 participa de la regulación de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo.

El Rojo Congo es un colorante que se une a compuestos fibrilares, evitando la formación de puentes de hidrógeno entre cadenas de polisacáridos y otras macromoléculas. En los hongos, este compuesto inhibe la correcta cristalización de la quitina, interfiriendo con el ensamblaje de la pared celular (Ruiz-Herrera, 2016). La susceptibilidad incrementada al Rojo Congo es una señal de que existen defectos en la pared celular de las mutantes en *PRMT1*. Generalmente, esta condición indica la existencia de niveles elevados de quitina, producto de la activación de la ruta de respuesta al estrés de la pared celular en el hongo, ante un estado de debilitamiento de la misma (Ram y Klis, 2006). En *N. crassa*, la interrupción de *amt-1* (*PRMT1*) ocasiona sensibilidad incrementada frente al inhibidor de la síntesis de ergosterol, voriconazol; por lo que AMT1 puede estar involucrada en procesos relacionados con la integridad de la membrana celular (Feldman et al., 2013). Lo anterior, sumado a la sensibilidad de la mutante de *U. maydis* a temperaturas altas y bajas, puede condicionar su habilidad de adaptarse a condiciones adversas en el ambiente, siendo más susceptible a condiciones hostiles. En *S. cerevisiae*, algunas mutantes de *HMT1* (*PRMT1*), son sensibles a temperaturas bajas (McBride et al., 2000). Prmt1 posiblemente regula genes implicados en la conformación o integridad de la pared celular y en la respuesta al estrés, lo que ocasiona una pérdida de viabilidad en las mutantes. Lo anterior probablemente contribuye a la disminución de la virulencia registrada (Richie et al., 2009).

La disminución de la intensidad de la reacción Fuzz entre las mutantes de *PRMT1* es un indicativo de que Prmt1 participa de la regulación de genes relacionados con el apareamiento y/o posterior desarrollo del filamento dicariótico. En este caso, el defecto se corrige al mezclar las cepas mutantes con las cepas silvestres. Las alteraciones en la conjugación y el desarrollo filamentosos posterior, afectan directamente la virulencia, debido a que estos son pasos obligatorios para que el hongo pueda infectar exitosamente a la planta del maíz. No existen reportes previos de proteínas ortólogas a Prmt1 que estén

involucradas en el dimorfismo en otros hongos. En *U. maydis*, la remoción de *HOS2* (desacetilasa de histonas) produjo un hallazgo similar, al interferir con la transición dimórfica. Esta condición, afectó significativamente la virulencia del hongo (Elias-Villalobos *et al.*, 2015). En la levadura *C. albicans*, la interrupción de *HOS2* provoca, a temperaturas altas, la hiperfilamentación del organismo en medio sólido (McBride *et al.*, 2007). En *U. maydis*, la mutación de *GCN5* (acetiltransferasa de histonas) genera un fenotipo micelial constitutivo que es independiente de las condiciones de pH y no afecta el apareamiento (Gonzalez-Prieto *et al.*, 2014). En nuestro caso, la capacidad de las mutantes en *PRMT1* de llevar a cabo la transición dimórfica por pH, permanece intacta.

En modelos como *N. crassa*, *C. cinérea* y *F. graminearum*, *PRMT1* es necesario para el crecimiento y desarrollo, sin embargo, existen otros modelos que, como *U. maydis*, no requieren del gen para estos procesos. Como ejemplos se encuentran *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. nidulans* y *A. flavus* (Bauer *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 2013; McBride *et al.*, 2007; Nakazawa *et al.*, 2010; Satterlee *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2006). Adicionalmente, la interrupción de *PRMT1* no afecta el crecimiento del hongo sobre fuentes de carbono complejas. En *S. cerevisiae*, *HMT1* (*PRMT1*) es importante para la formación y mantenimiento de la cromatina silenciada, y para el silenciamiento telomérico (Milliman *et al.*, 2012). Es posible que, como ocurre en otros organismos, la remoción de *PRMT1* ocasione la reducción de la marca H4R3me2 a lo largo del genoma de *U. maydis*, y esta sea la causa de los fenotipos registrados.

Respecto a la interrupción de *SET1*, se encontró que esta afecta notablemente la morfología celular y colonial de *U. maydis*, ocasiona hipersensibilidad al H₂O₂, al Rojo Congo y al NaCl, genera hiperfilamentación a pH 3.0, la producción de un pigmento café que da color a las colonias y el retraso en la maduración de los tumores en la planta de maíz con una producción alta de antocianinas. Se determinó que estos defectos no afectan significativamente la virulencia del hongo y que, Set1 no participa de la regulación del proceso patogénico hasta la formación de tumores. En los ascomicetos *C. albicans*, *M. oryzae*, *F. graminearum* y *F. fujikuroi*, Set1 es importante para la virulencia (Janevska *et al.*, 2018b; Liu *et al.*, 2015b; Pham *et al.*, 2015; Raman *et al.*, 2006), sin embargo, en *A. fumigatus*, la deficiencia de las marcas H3K4me2 y H3K4me3 no altera la virulencia de

hongo en modelo murino (Palmer *et al.*, 2013). No existen reportes en hongos fitopatógenos biótrofos o basidiomicetos. En otros organismos fúngicos, la función del Set1 podría no estar vinculada a la virulencia.

Si bien, como ya se indicó, la mutación de *SET1* no ocasiona la disminución de la virulencia, un hallazgo importante es el retraso en la maduración de los tumores producidos por la mezcla de mutantes, con respecto a los generados por la mezcla de cepas silvestres, así como la producción alta de antocianinas en los mismos. La inducción de la producción de antocianinas por parte de la planta, es un mecanismo que utiliza *U. maydis* para evitar la lignificación de esta y facilitar así la propagación del hongo en sus tejidos (Lanver *et al.*, 2017). En *U. maydis*, la interrupción de *TIN2*, gen que hace parte del *cluster* más largo identificado en el hongo (19A), produce como fenotipo la carencia total de acumulación de antocianinas en los tejidos de la planta. Tin2 (proteína efectora de secreción) interactúa con la proteína citoplasmática del maíz ZmTTK1, evitando su ubiquilación y degradación. La estabilización de ZmTTK1 por parte de Tin2, hace que el factor de transcripción ZmR1, el cual induce genes para la biosíntesis de antocianinas, se localice en el núcleo (Brefort *et al.*, 2014; Lanver *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2014). La desregulación de Tin2 podría potenciar la ruta de síntesis de antocianinas. Set1 puede estar encargado de la regulación de algunos de los pasos de éste proceso.

Alteraciones morfológicas similares a las encontradas en *U. maydis*, se han reportado en mutantes de *SET1* de otros organismos como *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Nislow *et al.*, 1997; Raman *et al.*, 2006; South *et al.*, 2013). En *U. maydis* la remoción de Set1 ocasiona un notable alargamiento y adelgazamiento de las células en medio líquido, y la formación de pequeños filamentos tanto en medio líquido, como en sólido. La tinción con calcofluor blanco demostró que, entre algunas células madre e hija no se produce la separación luego de la división celular, lo que genera pequeños micelios septados. En *S. cerevisiae*, Set1 es importante para la segregación cromosomal en la mitosis, al metilar la proteína Dam1 del cinetocoro. Existe una intercomunicación entre las modificaciones sobre las histonas y las modificaciones sobre proteínas no histonas, por lo que los cambios en los estados de las cromatina pueden señalar cambios funcionales en otras proteínas celulares y maquinarias (Latham *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005). En *A. nidulans* se demostró que

para que se produzca una mitosis exitosa, el complejo Set1/COMPASS tiene que cooperar con las kinasas NIMA y CDK1. El complejo Set 1 regula la entrada en mitosis con CDK1, y su progresión con NIMA (Govindaraghavan *et al.*, 2014). En base a nuestros hallazgos, es posible que en *U. maydis* exista un defecto en la división celular, probablemente en la citocinesis, asociado a la carencia de Set1.

Lo anterior, sumado a los defectos encontrados en las cepas mutantes en respuesta a agentes que generan estrés en la pared celular, también podría indicar la presencia de alteraciones en la estructura y/o composición de este organelo, en tanto es el responsable de la morfología del organismo (Gow *et al.*, 2017). En *S. cerevisiae*, las mutantes en *SET1* poseen una pared celular 10-20% más delgada respecto a las células silvestres, así como bajos niveles de ergosterol. El ergosterol es el único esteroide de la membrana fúngica y regula su fluidez, grosor, permeabilidad, biogénesis y función (Nislow *et al.*, 1997; Zhang y Rao, 2010). En *M. oryzae*, aproximadamente la mitad de los genes que se activan o se reprimen durante la morfogénesis asociada con la infección, son dependientes de Set1 (Pham *et al.*, 2015) No se puede descartar que la tendencia a formar micelios en condiciones normales de crecimiento, y la hiperfilamentación observada a pH ácido, se deban a alteraciones de la ruta PKA-cAMP (Gold *et al.*, 1994; Martinez-Espinoza *et al.*, 2004; Nadal *et al.*, 2008; Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2001). Set1 podría actuar como un inhibidor de la filamentación. En *C. albicans*, la desacetilasa de histonas Hos2 lleva a cabo este papel (Zacchi *et al.*, 2010).

Nadal-Ribelles *et al.* (2015), establecieron que la metilación de H3K4 determina la especificidad de los complejos remodeladores de la cromatina hacia los genes de respuesta al estrés osmótico. En presencia de la marca, los genes de respuesta al estrés son remodelados por el complejo RSC, permitiendo su inducción a través de una reorganización nucleosomal fuerte. La ausencia de esta remodelación llevaría a deficiencias en la expresión de los genes de respuesta a estrés. Es posible también que, ante la ausencia de la metilación de H3K4, otros complejos remodeladores diferentes a RSC, suplan esta función. La hipersensibilidad al H₂O₂, al Rojo Congo y al estrés osmótico de la cepa mutante en *SET1* de *U. maydis* podría explicarse por la regulación que Set1 ejerce normalmente sobre las respuestas a estrés. En *F. graminearum*, por

ejemplo, la mutación tiene un efecto contrario al incrementar la resistencia del hongo a agentes que dañan la pared celular (Liu *et al.*, 2015b).

Recientemente, se reportó en *U. maydis* que la mutación del gen *Rrm75*, el cual codifica para una proteína chaperona del RNA, ocasiona morfología colonial de dona, disminución en el apareamiento y del crecimiento filamentoso posterior al apareamiento, y virulencia reducida. La mutante también exhibe mayor sensibilidad al estrés por temperatura, acumulación de pigmento café, H₂O₂ y peroxisomas. La acumulación de H₂O₂ hace que esta cepa sea más susceptible a la aplicación de H₂O₂ externo. La mutación igualmente induce el incremento en la actividad de la enzima catalasa. La aplicación exógena de catalasa alivia la acumulación de H₂O₂ en esta cepa. Como se abordó previamente, los en los organismos aerobios la primera línea de defensa contra la acumulación de ROS, es el incremento en la actividad de las principales enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa y la catalasa (Krumova *et al.*, 2009; Rodriguez-Pina *et al.*, 2019).

Se ha encontrado que en organismos como *A. nidulans*, *A. fumigatus* y *F. graminearum*, la metilación de H3K4 es importante para la regulación del metabolismo secundario. En *A. nidulans* y *A. fumigatus*, la ausencia de esta marca permite la expresión de *clusters* de metabolitos secundarios crípticos y gliotoxina; en *F. graminearum*, ocasiona que los niveles de producción de DON y del pigmento aurofusarina sean bajos (Bok *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015b; Palmer *et al.*, 2013). En *U. maydis* encontramos que la mutación de *SET1* desencadena la producción de un pigmento color café de composición desconocida, en las colonias del hongo y los medios de crecimiento. Las células no adquieren la coloración. La producción de este pigmento es dependiente de temperatura (no se sintetiza a temperaturas bajas), y es dependiente de la fuente de carbono de crecimiento (no se produce en presencia de glicerol). Como se mencionó anteriormente, la mutación de *Rrm75* en *U. maydis* también induce la acumulación de pigmento café a temperaturas de 28 °C y 37 °C, pero no a 15 °C. En este caso, se estableció que dicho pigmento corresponde a melanina. La melanina es un pigmento multifuncional que está involucrado en la defensa contra el estrés ambiental, como la exposición a la luz ultravioleta, agentes oxidantes y radiación ionizante. Se ha reportado que la melanina confiere a los hongos la capacidad de sobrevivir a ambientes hostiles, tolerancia a la desecación en temperaturas extremas,

quimio-protección al absorber radicales libres, resistencia a la actividad de enzimas hidrolíticas, metales pesados y antimicrobianos, protección contra el estrés oxidativo y la radiación UV (Goncalves *et al.*, 2012; Rodriguez-Pina *et al.*, 2019). En *C. neoformans* se demostró que las células melanizadas tienen un porcentaje de sobrevivencia más alto que las no melanizadas, cuando se exponen a derivados del oxígeno y del nitrógeno (Wang y Casadevall, 1994). En *Exhophiala dermatitidis*, las células defectuosas en la producción de melanina son destruidas por neutrófilos humanos en una mayor proporción, que las células silvestres (Schnitzler *et al.*, 1999). La melanina extraída de *A. nidulans* tiene la capacidad de proteger frente a la acción de HOCl, uno de los oxidantes más abundantes y tóxicos (de Cassia y Pombeiro-Sponchiado, 2005). La acumulación de pigmentos café oscuros en muchos hongos está asociado a respuestas de estrés ambiental (Rodriguez-Pina *et al.*, 2019). Es posible que la mutante se SET1 se encuentre bajo estrés constante, lo que la lleva a la síntesis del pigmento café en búsqueda de protección frente al agente de estrés. De acuerdo a las evidencias, probablemente el agente de estrés sea de tipo oxidativo. En otro trabajo de *U. maydis* mencionado previamente, la interrupción de *yap1*, gen que codifica para una proteína que regula la respuesta al estrés oxidativo, genera mutantes que exhiben pigmentación café e hipersensibilidad al estrés por H₂O₂ (Molina y Kahmann, 2007). El gen *yap1* se encuentra inducido en la mutante de *Rrm75* bajo condiciones óptimas (Rodriguez-Pina *et al.*, 2019).

La metilación de H3K4 no es la única marca de metilación de las histonas que se ha involucrado con la regulación del metabolismo secundario en los hongos. La ausencia de ClrD de *A. fumigatus* (DIM-5, metila H3K9) ocasiona la reducción la pigmentación de las colonias (Palmer *et al.*, 2008). En *A. nidulans*, la interrupción de los genes *hepA* (*HPI*, necesario para la metilación de H3K9) y *clrD* (*clr4*, codifica para la proteína que metila H3K9), ocasiona la sobreexpresión de algunos de los genes del grupo involucrado en la producción de esterigmatocistina. La mutante de *hepA* también evidencia la sobreexpresión del gen *LaeA*, que codifica para el regulador general de la síntesis de metabolitos secundarios en los hongos. *LaeA* es la proteína encargada de mediar la remoción de las marcas heterocromáticas cuando se activa el metabolismo secundario. (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). En *F. graminearum*, la falta de HEP1 (*HP1*), incrementa la síntesis de aurofusarina, y la remoción de KMT6 (metila H3K27), permite la expresión

constitutiva de genes que codifican para micotoxinas, pigmentos y otros metabolitos secundarios (Connolly *et al.*, 2013; Reyes-Dominguez *et al.*, 2012).

Aunque es un área de investigación menos conocida, *U. maydis* también se ha estudiado para la producción de metabolitos secundarios. Zuther *et al.* (2008), demostraron que *U. maydis* es capaz de generar pigmentos del indol, de color café, cuando crece en presencia de triptófano como única fuente de nitrógeno. Se desconocen las posibles ventajas de estos metabolitos para el organismo. Algunos de estos pigmentos son iguales a los sintetizados por el basidiomiceto *Malassezia furfur*, los cuales son considerados importantes para su patogenicidad en los humanos (Bolker *et al.*, 2008; Zuther *et al.*, 2008). Es probable que el cambio en la pigmentación de las colonias de *U. maydis* luego de una mutación sea un hallazgo más frecuente, no obstante, es usualmente no reportado.

En *S. cerevisiae*, la proteína Set1 no es indispensable para la viabilidad del hongo, sin embargo, en su ausencia las colonias del organismo son más pequeñas y presentan retraso en el crecimiento (Nislow *et al.*, 1997). En *N. crassa* este gen tampoco es esencial, pero actúa como un regulador del gen *frq*, importante para el control del ciclo circadiano y de luz en el hongo (Raduwan *et al.*, 2013). En contraste a los anteriores fenotipos, la pérdida de Set1 en *M. oryzae*, además de la reducción de la virulencia, ocasiona defectos serios en el crecimiento vegetativo, la formación de apresorio y la conidiación (Pham *et al.*, 2015). Set1 regula en este organismo la activación dependiente de sustrato de las enzimas que degradan la pared celular (Pham *et al.*, 2014). La pérdida de Set1 en *F. graminearum* causa reducción del crecimiento de las hifas, reducción dramática de la virulencia, de la síntesis de DON y aurofusarina, y el incremento de la síntesis de pigmentos amarillos (Liu *et al.*, 2015b). En *F. fujikuroi*, Set1 actúa como un activador de la conidiación, su ausencia prácticamente termina con la reproducción asexual. Además afecta el crecimiento vegetativo y atenúa la virulencia (Janevska *et al.*, 2018b). En el caso de *U. maydis*, sumado a los fenotipos ya descritos, *SET1* no se requiere para la viabilidad, uso de fuentes de carbono alternativas y el apareamiento. No obstante, la mutación ocasiona que el hongo produzca colonias más pequeñas. De lo anterior se podría concluir que, en algunas especies de hongos, Set1 tiene una función particular en la regulación de procesos específicos, mientras en otras, ejerce un papel más global (Studt *et al.*, 2016). Teniendo

encuentra lo aquí reportado, es posible que en *U. maydis*, Set1 desempeñe un rol a gran escala en la regulación de varios procesos.

Con respecto a la interrupción de *SUV39*, dentro de lo evaluado, los fenotipos más relevantes encontrados derivados de la mutación del gen, son la maduración acelerada de los tumores generados por la mezcla de mutantes en las plantas de maíz (mayor número de teliosporas), la circunscripción de estos a la vena principal de la hoja, de forma compacta, y la mayor tasa de crecimiento registrada durante la cinética de crecimiento. Aparentemente, la carencia de este gen hace que el hongo no se pueda dispersar normalmente por la hoja, por lo que Suv39 podría regular el proceso de colonización de la planta. La observación de una cantidad mayor de teliosporas maduras en los tumores al final del ensayo podría indicar que el proceso patogénico ocurre de forma más rápida en la ausencia de Suv39. Lo anterior podría estar relacionado con el mayor crecimiento registrado durante las pruebas en laboratorio. De lo anterior podría deducirse que Suv39 también actúa como represor de algunos genes que participan del proceso patogénico y del control del ciclo celular del hongo como saprofito y en la planta. La metilación de H3K9 es una marca que normalmente señala represión génica y formación de heterocromatina. En otros modelos fúngicos, la metilación de H3K9 es importante para la segregación cromosomal, el crecimiento, el metabolismo secundario, la reproducción asexual, sensibilidad a agentes que desestabilizan los microtúbulos y la patogenicidad (Allshire *et al.*, 1995; Ekwall *et al.*, 1996; Ekwall y Ruusala, 1994; Freitag *et al.*, 2004; Reyes-Dominguez *et al.*, 2012; Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Soyer *et al.*, 2014). No obstante, su principal rol a nivel molecular es establecer la intercomunicación con la metilación del DNA para señalar en conjunto el silenciamiento de la cromatina (Du *et al.*, 2015a).

En cuanto a los otros aspectos evaluados, no se encontraron fenotipos alejados de lo observado en las cepas silvestres. Lo anterior implica que, en *U. maydis*, la metilación de H3K9 es dispensable para esos procesos. Entre los hongos en los que no se lleva a cabo la metilación de H3K9 se encuentran *C. albicans* y *S. cerevisiae*; de estos dos, *S. cerevisiae*, no metila el DNA (Freire-Beneitez *et al.*, 2016b; Mishra *et al.*, 2011). En estos dos organismos la formación de heterocromatina es orquestada principalmente por las

proteínas desacetilasas de histonas, sirtuinas (Sir2) (Freire-Beneitez *et al.*, 2016a; Grunstein y Gasser, 2013; Haber, 2012). De otra parte, *S. pombe* si metila H3K9 y no metila el DNA. La heterocromatina en este organismo se caracteriza por la presencia alta de metilación de H3K9, así como por una generalizada desacetilación de las histonas, sin embargo, se ha demostrado que la metilación de H3K9 no es necesaria para el silenciamiento de ciertos loci y que existen rutas alternativas para tal fin, que involucran principalmente HDACs (Clr3, Clr6) y Clr5 (Hansen *et al.*, 2011). En *U. maydis*, no existen estudios relacionados con el proceso de formación de heterocromatina. Si este proceso ocurre de forma similar a lo reportado en *S. pombe*, es posible que las actividades de las HDACs puedan suplir la ausencia de la metilación de H3K9 en algunas regiones del genoma, y que Suv39 esté regulando en el hongo procesos muy específicos como el desarrollo y colonización en la planta. Como ya se indicó, se ha planteado que, a lo largo de la evolución, *U. maydis* removió de su genoma la maquinaria necesaria para llevar a cabo la metilación del DNA (Laurie *et al.*, 2012; Laurie *et al.*, 2013). El hecho de que conserve a Suv39, indica que esta proteína se requiere para la formación de heterocromatina.

Además de las mutaciones de *SUV39*, *SET1* y *PRMT1*, se llevó a cabo la re-introducción de los genes silvestres *SET1* y *PRMT1* en las cepas mutantes correspondientes (locus de resistencia a la carboxina). Lo anterior, con el propósito de revertir los defectos generados por las interrupciones y demostrar que estos son producto de las mutaciones respectivas. Sorpresivamente, en ambos casos las complementaciones logradas fueron parciales, e incluso perjudiciales para la virulencia. En el caso de la complementación de *PRMT1*, la incorporación del gen silvestre a las cepas mutantes permitió revertir los defectos ligeros en la apariencia de las colonias, así como en la sensibilidad a las temperaturas altas y bajas. En cuanto a la hipersensibilidad al H₂O₂, la cepa complementada se mostró más tolerante al efecto del compuesto, que la cepa silvestre. El defecto en el apareamiento entre las cepas mutantes se corrigió, pero no la susceptibilidad incrementada al Rojo Congo. La virulencia del hongo no se restablece con la mezcla de cepa silvestre y cepa mutante, o cepa silvestre y cepa complementada. La virulencia se desploma por completo cuando se mezclan las cepas complementadas de ambos sexos. Todo lo contrario, a lo esperado.

La situación es bastante similar para las complementaciones de *SET1*. En este caso se corrigieron las alteraciones en la morfología y pigmentación colonial, en la morfología celular, la hipersensibilidad al estrés por H₂O₂, Rojo Congo y NaCl. Sin embargo, como en el caso anterior, las mezclas entre la cepa silvestre y la cepa complementada, así como entre cepas complementadas, ocasionan una pérdida de virulencia remarcable que, originalmente no se produjo con la eliminación del gen. Una posible explicación para lo observado es que, durante la retro-transformación de los protoplastos mutantes con los casetes de complementación, se produjeron mutaciones ectópicas inesperadas que, alteraron la integridad del genoma. Lo anterior puede ser verificado con un ensayo de Southern blot. De confirmarse, esa podría ser la razón de la pérdida de la virulencia asociada a la complementación. Otra explicación a la complementación parcial, es que la longitud de la región 5' corriente arriba de los genes, que fue empleada para cada construcción de complementación (aproximadamente 1000 pb), no sea suficiente para complementar el fenotipo mutante en su totalidad. En el caso de *SET1* parecería improbable, dado que el espacio que separa a *SET1* del siguiente ORF es de 1047 pb. Para la elaboración de la construcción se habría utilizado prácticamente toda la región promotora posible. La distancia que separa a *PRMT1* del siguiente ORF es de 974 pb, por lo que, en este caso, la longitud de la construcción tampoco parece ser una causa probable (Huh *et al.*, 2017). Una tercera explicación involucra conocer el nivel de expresión que alcanza el gen re-introducido en la cepa complementada. Huh *et al.* (2017), encontraron en una cepa complementada de *M. oryzae*, que el gen silvestre *JMJI* (desmetilasa de histonas, H3K4) re-insertado, estaba sobre-regulado en su(s) nueva(s) posición(es). Esta cepa fue incapaz de recobrar la virulencia perdida tras la interrupción de *JMJI*. Lee *et al.* (2009) también encontraron que, en *A. nidulans*, las cepas complementadas con el gen *hdaA* (codifica para una desacetilasa de histonas) sobre-expresan *hdaA* por razones desconocidas. La sobre-expresión puede estar asociada a la nueva localización cromosomal, y al nuevo ambiente epigenético de donde se produce la re-inserción. Una sobre-regulación de *SET1* o *PRMT1* podría ocasionar la desregulación de muchos otros genes, llevándonos al fenotipo observado. Para evitar este posible inconveniente se podría clonar el gen silvestre en un plásmido auto-replicativo para su expresión en el hongo. No se puede descartar que la mutación original de lugar a una desestabilización del genoma

que facilite la adquisición de nuevas mutaciones a lo largo de las nuevas generaciones (Huh *et al.*, 2017).

Aunque no es frecuente, es posible que las complementaciones den lugar a fenotipos intermedios, entre lo observado en la cepa silvestre y la cepa mutante. Por ejemplo, Connolly *et al.* (2013), reportaron que la complementación de *kmt6* en un locus ectópico de la cepa $\Delta kmt6$ de *F. graminearum*, dio origen a un fenotipo con una tasa de crecimiento intermedia, más rápida que la de la mutante, pero no como la de la cepa silvestre; con pigmentación casi normal, y con la capacidad de formar ascosporas, aunque en el doble del tiempo de la cepa silvestre.

En este estudio demostramos que el gen *PRMT1*, el cual codifica para la metiltransferasa de arginina Prmt1 (H4R3), se requiere para la virulencia completa de *U. maydis* en la planta de maíz, así como para el apareamiento del hongo, y sus respuestas frente a condiciones de estrés ambiental. El gen *SET1*, que codifica para la metiltransferasa de lisina Set1 (H3K4), es importante para el desarrollo normal de *U. maydis*, así como para sus respuestas frente a condiciones de estrés ambiental. El gen *SUV39*, el cual codifica para la metiltransferasa de lisina Suv39 (H3K9), posiblemente se requiere para la colonización y el desarrollo del hongo en la planta. Lo anteriormente expuesto es una evidencia de la relevancia que tienen las proteínas metiltransferasas de histonas en la regulación de diversos procesos en los hongos, así como de su rol en el desarrollo y la virulencia de *U. maydis*.

9 CONCLUSIONES

1. Se caracterizaron los genes *SET1*, *PRMT1* y *SUV39* en *U. maydis*. Se identificaron e interrumpieron los genes *SET1*, *PRMT1* y *SUV39*; y se complementaron las cepas mutantes $\Delta SET1$ y $\Delta PRMT1$, con los genes silvestres correspondientes.
2. Se caracterizaron fenotípicamente las cepas $\Delta SET1$, $\Delta PRMT1$, $\Delta SUV39$, $\Delta SET1::SET1$ y $\Delta PRMT1::PRMT1$.

La mutación de *PRMT1* ocasionó alteraciones ligeras en la morfología colonial, susceptibilidad aumentada frente a temperaturas de crecimiento bajas y altas, sensibilidad incrementada a la exposición a H₂O₂ y al Rojo Congo, y una ligera alteración en la capacidad de apareamiento entre las cepas mutantes de ambos sexos. La complementación revirtió todos estos defectos, con excepción de la hipersensibilidad al Rojo Congo. *PRMT1* es dispensable para la viabilidad, el crecimiento en fuentes de carbono alternativas, la transición dimórfica por pH y la respuesta frente al estrés osmótico.

La mutación de *SET1* afecta notablemente la morfología celular y colonial de *U. maydis*, ocasiona hipersensibilidad al H₂O₂, al Rojo Congo y al estrés osmótico por NaCl. Genera hiperfilamentación a pH 3.0, así como la producción de un pigmento café que da color a las colonias. La complementación revirtió todos estos defectos. *Set1* es dispensable para la viabilidad, el crecimiento en fuentes de carbono alternativas, el apareamiento, y la transición dimórfica por pH.

La mutación de *SUV39* comprobó que este gen participa del control del ciclo celular del hongo, al presentar una tasa de crecimiento acelerada con respecto a la cepa silvestre, durante los ensayos de cinética de crecimiento.

3. Se evaluó la virulencia de las cepas $\Delta SET1$, $\Delta PRMT1$, $\Delta SUV39$, $\Delta SET1::SET1$ y $\Delta PRMT1::PRMT1$, en plántulas de maíz.

De los tres genes de trabajo, únicamente *PRMT1* demostró que se requiere para la virulencia completa de *U. maydis* en la planta de maíz. La mezcla de mutantes AV3 (*alb1* $\Delta PRMT1$) X AV6 (*a2b2* $\Delta PRMT1$) generó un incremento del 13.2% en las plantas sanas, del 6% en plantas con clorosis y/o antocianinas y una reducción del 16.2% en plantas con tumores grandes (> 1 cm), con respecto a la mezcla de cepas silvestres. Al final de los ensayos de invernadero, los tumores generados por la mezcla de mutantes evidenciaron retraso en su maduración. No se consiguió la reversión de este fenotipo a través de la complementación.

La mutación de *SET1* ocasionó retraso en la maduración tumoral, así como el incremento de la síntesis de antocianinas en éstas estructuras.

La mutación de *SUV39* generó maduración tumoral acelerada, así como la circunscripción de la síntesis de tumores en las hojas de la planta, a la vena central.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, no se rechaza la hipótesis de que existe una relación entre la función de algunas proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina y la virulencia de *Ustilago maydis*.

10 REFERENCIAS

- Adhvaryu, K.K., Morris, S.A., Strahl, B.D., Selker, E.U., 2005. Methylation of histone H3 lysine 36 is required for normal development in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 4, 1455-1464.
- Agrios, G., 2005. *Plant Pathology*, 5 ed. Dana Dreibelbis, USA.
- Allis, C.A., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M.L., 2007. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Estados Unidos de América.
- Allshire, R.C., Ekwall, K., 2015. Epigenetic Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018770.
- Allshire, R.C., Nimmo, E.R., Ekwall, K., Javerzat, J.P., Cranston, G., 1995. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* 9, 218-233.
- Angeletti, B., Battiloro, E., Pascale, E., D'Ambrosio, E., 1995. Southern and northern blot fixing by microwave oven. *Nucleic Acids Res* 23, 879-880.
- Aquea, F., Timmermann, T., Arce-Johnson, P., 2010. Analysis of histone acetyltransferase and deacetylase families of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol Biochem* 48, 194-199.
- Aramayo, R., Selker, E.U., 2013. *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a017921.
- Aravind, L., Abhiman, S., Iyer, L.M., 2011. Natural History of the Eukaryotic Chromatin Protein Methylation System. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 101, 105-176.
- Attwood, J.T., Yung, R.L., Richardson, B.C., 2002. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 241-257.
- Aydoğdu, M., Gölükçü, M., 2017. Nutritional value of huitlacoche, maize mushroom caused by *Ustilago maydis*. *Food Science and Technology* 37, 531-535.
- Baidyaroy, D., Brosch, G., Ahn, J.H., Graessle, S., Wegener, S., Tonukari, N.J., Caballero, O., Loidl, P., Walton, J.D., 2001. A gene related to yeast HOS2 histone deacetylase affects

extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus. *The Plant cell* 13, 1609-1624.

Bakkeren, G., Kamper, J., Schirawski, J., 2008. Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol* 45 Suppl 1, S15-21.

Banuett, F., Herskowitz, I., 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5878-5882.

Banuett, F., Herskowitz, I., 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122, 2965-2976.

Banuett, F., Herskowitz, I., 2002. Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 37, 149-170.

Battistini, F., Hunter, C.A., Gardiner, E.J., Packer, M.J., 2010. Structural mechanics of DNA wrapping in the nucleosome. *Journal of molecular biology* 396, 264-279.

Bauer, I., Graessle, S., Loidl, P., Hohenstein, K., Brosch, G., 2010. Novel insights into the functional role of three protein arginine methyltransferases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 47, 551-561.

Bauer, R., Begerow, D., Oberwinkler, F., Piepenbring, M., Berbee, M.L., 2001. Ustilaginomycetes, in: McLaughlin, D.I., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota VII Part B*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 57-83.

Bauer, R., Oberwinkler, F., Vanky, K., 1997. Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can J Bot* 75, 1273-1314.

Begerow, D., Schäfer, A.M., Kellner, R., Yurkov, A., Kemler, M., Oberwinkler, F., Bauer, R., 2014. Ustilaginomycotina, in: McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (Eds.), *The Mycota VII Part A*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 295-329.

Bernstein, B.E., Tong, J.K., Schreiber, S.L., 2000. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13708-13713.

Blanc, R.S., Richard, S., 2017. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular cell* 65, 8-24.

Bok, J.W., Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H.C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B.R., Wang, C.C., Keller, N.P., 2009. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol* 5, 462-464.

Bolker, M., Basse, C.W., Schirawski, J., 2008. *Ustilago maydis* secondary metabolism-from genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol* 45 Suppl 1, S88-93.

Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., Kahmann, R., 1995. Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany* 73, 320-325.

Bortfeld, M., Auffarth, K., Kahmann, R., Basse, C.W., 2004. The *Ustilago maydis* a2 mating-type locus genes Iga2 and rga2 compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. *Plant Cell* 16, 2233-2248.

Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., Kahmann, R., 2001. Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 42, 1047-1063.

Brandao, F., Esher, S.K., Ost, K.S., Pianalto, K., Nichols, C.B., Fernandes, L., Bocca, A.L., Pocas-Fonseca, M.J., Alspaugh, J.A., 2018. HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence. *Sci Rep* 8, 5209.

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., Kahmann, R., 2009. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* 47, 423-445.

Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V., Kahmann, R., 2014. Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 10, e1003866.

Breitenbach, M., Weber, M., Rinnerthaler, M., Karl, T., Breitenbach-Koller, L., 2015. Oxidative stress in fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. *Biomolecules* 5, 318-342.

Brosch, G., Loidl, P., Graessle, S., 2008. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 32, 409-439.

Cai, Q., Wang, J.J., Fu, B., Ying, S.H., Feng, M.G., 2018. Gcn5-dependent histone H3 acetylation and gene activity is required for the asexual development and virulence of *Beauveria bassiana*. *Environ Microbiol* 20, 1484-1497.

Camejo, D., Guzman-Cedeno, A., Moreno, A., 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* 103, 10-23.

- Canovas, D., Marcos, A.T., Gacek, A., Ramos, M.S., Gutierrez, G., Reyes-Dominguez, Y., Strauss, J., 2014. The histone acetyltransferase GcnE (GCN5) plays a central role in the regulation of *Aspergillus* asexual development. *Genetics* 197, 1175-1189.
- Carbo, N., Perez-Martin, J., 2008. Spa2 is required for morphogenesis but it is dispensable for pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 45, 1315-1327.
- Catania, S., Dumesic, P.A., Stoddard, C., Cooke, S., Burke, J., Cuomo, C.A., Narlikar, G.J., Madhani, H.D., , 2017. Epigenetic maintenance of DNA methylation after evolutionary loss of the de novo methyltransferase bioRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 1-23.
- Chang, H.C., Guarente, L., 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25, 138-145.
- Chang, P., Fan, X., Chen, J., 2015. Function and subcellular localization of Gcn5, a histone acetyltransferase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 81, 132-141.
- Chaubal, A., Pile, L.A., 2018. Same agent, different messages: insight into transcriptional regulation by SIN3 isoforms. *Epigenetics Chromatin* 11, 17.
- Chavez-Ontiveros, J., Espinoza, A.M., Ruiz-Herrera, J., 2000. Double chitin synthetase mutants from the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytologist* 146, 335-341.
- Chen, T., Li, E., 2006. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current topics in microbiology and immunology* 301, 179-201.
- Chen, Z.X., Riggs, A.D., 2011. DNA methylation and demethylation in mammals. *The Journal of biological chemistry* 286, 18347-18353.
- Choudhuri, S., 2011. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicology mechanisms and methods* 21, 252-274.
- Choudhuri, S., Cui, Y., Klaassen, C.D., 2010. Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 378-393.
- Christensen, J.J., 1963. Corn Smut Caused by *Ustilago maydis*, in: *Miscellaneous Journal Series, M.A.E.S. (Ed.), Monograph No. 2 American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, p. 52.*
- Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J., Pillus, L., 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 19, 2515-2526.

- Clarke, A.S., Samal, E., Pillus, L., 2006. Distinct roles for the essential MYST family HAT Esa1p in transcriptional silencing. *Mol Biol Cell* 17, 1744-1757.
- Clinton, G.P., 1906. *Ustilaginales*. The New York Botanical Garden Lancaster, PA.
- Coelho, M.A., Sampaio, J.P., Goncalves, P., 2010. A deviation from the bipolar-tetrapolar mating paradigm in an early diverged basidiomycete. *PLoS Genet* 6.
- Connolly, L.R., Smith, K.M., Freitag, M., 2013. The *Fusarium graminearum* histone H3 K27 methyltransferase KMT6 regulates development and expression of secondary metabolite gene clusters. *PLoS Genet* 9, e1003916.
- Cruickshank, M.N., Besant, P., Ulgiati, D., 2010. The impact of histone post-translational modifications on developmental gene regulation. *Amino acids* 39, 1087-1105.
- D'Oto, A., Tian, Q.W., Davidoff, A.M., Yang, J., 2016. Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *J Med Oncol Ther* 1, 34-40.
- Dang, V.D., Benedik, M.J., Ekwall, K., Choi, J., Allshire, R.C., Levin, H.L., 1999. A new member of the Sin3 family of corepressors is essential for cell viability and required for retroelement propagation in fission yeast. *Mol Cell Biol* 19, 2351-2365.
- Day, P.R., Anagnostakis, S.L., Puhalla, J.E., 1971. Pathogenicity resulting from mutation at the b locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 533-535.
- de Cassia, R.G.R., Pombeiro-Sponchiado, S.R., 2005. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol Pharm Bull* 28, 1129-1131.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13, 414-430.
- Di Lorenzo, A., Bedford, M.T., 2011. Histone arginine methylation. *FEBS letters* 585, 2024-2031.
- Ding, S., Mehrabi, R., Koten, C., Kang, Z., Wei, Y., Seong, K., Kistler, H.C., Xu, J.R., 2009. Transducin beta-like gene FTL1 is essential for pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Eukaryot Cell* 8, 867-876.
- Ding, S.L., Liu, W., Iliuk, A., Ribot, C., Vallet, J., Tao, A., Wang, Y., Lebrun, M.H., Xu, J.R., 2010. The tlg1 histone deacetylase complex regulates infectious growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant cell* 22, 2495-2508.

Doehlemann, G., Okmen, B., Zhu, W., Sharon, A., 2017. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiol Spectr* 5.

Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., Patel, D.J., 2015a. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 519-532.

Du, Q., Luu, P.L., Stirzaker, C., Clark, S.J., 2015b. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* 7, 1051-1073.

Dubey, A., Jeon, J., 2017. Epigenetic regulation of development and pathogenesis in fungal plant pathogens. *Mol Plant Pathol* 18, 887-898.

Eissenberg, J.C., Elgin, S., 2014. Heterochromatin and Euchromatin, in: area, M.b. (Ed.), eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 1-9.

Ekwall, K., Nimmo, E.R., Javerzat, J.P., Borgstrom, B., Egel, R., Cranston, G., Allshire, R., 1996. Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function. *J Cell Sci* 109 (Pt 11), 2637-2648.

Ekwall, K., Ruusala, T., 1994. Mutations in *rik1*, *clr2*, *clr3* and *clr4* genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast. *Genetics* 136, 53-64.

Elias-Villalobos, A., Fernandez-Alvarez, A., Moreno-Sanchez, I., Helmlinger, D., Ibeas, J.I., 2015. The Hos2 Histone Deacetylase Controls *Ustilago maydis* Virulence through Direct Regulation of Mating-Type Genes. *PLoS Pathog* 11, e1005134.

Feldman, D., Ziv, C., Gorovits, R., Efrat, M., Yarden, O., 2013. *Neurospora crassa* protein arginine methyl transferases are involved in growth and development and interact with the NDR kinase COT1. *PLoS One* 8, e80756.

Freire-Beneitez, V., Gourlay, S., Berman, J., Buscaino, A., 2016a. Sir2 regulates stability of repetitive domains differentially in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 44, 9166-9179.

Freire-Beneitez, V., Price, R.J., Tarrant, D., Berman, J., Buscaino, A., 2016b. *Candida albicans* repetitive elements display epigenetic diversity and plasticity. *Sci Rep* 6, 22989.

Freitag, M., 2017. Histone Methylation by SET Domain Proteins in Fungi. *Annual review of microbiology* 71, 413-439.

Freitag, M., Hickey, P.C., Khlafallah, T.K., Read, N.D., Selker, E.U., 2004. HP1 is essential for DNA methylation in *Neurospora*. *Molecular cell* 13, 427-434.

- Galagan, J.E., Selker, E.U., 2004. RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends Genet* 20, 417-423.
- Gayatri, S., Bedford, M.T., 2014. Readers of histone methylarginine marks. *Biochim Biophys Acta* 1839, 702-710.
- Georgakopoulos, T., Thireos, G., 1992. Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J* 11, 4145-4152.
- Gilbreth, M., Yang, P., Bartholomeusz, G., Pimental, R.A., Kansra, S., Gadiraju, R., Marcus, S., 1998. Negative regulation of mitosis in fission yeast by the shk1 interacting protein skb1 and its human homolog, Skb1Hs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14781-14786.
- Gilbreth, M., Yang, P., Wang, D., Frost, J., Polverino, A., Cobb, M.H., Marcus, S., 1996. The highly conserved skb1 gene encodes a protein that interacts with Shk1, a fission yeast Ste20/PAK homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13802-13807.
- Gladyshev, E., 2017. Repeat-Induced Point Mutation and Other Genome Defense Mechanisms in Fungi. *Microbiol Spectr* 5.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K., Kronstad, J., 1994. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* 8, 2805-2816.
- Goll, M.G., Bestor, T.H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- Goncalves, R.C., Lisboa, H.C., Pombeiro-Sponchiado, S.R., 2012. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 1467-1474.
- González-Prieto, J.M., 2003. Análisis de algunos genes involucrados en la remodelación de la estructura de la cromatina en hongos dimórficos, Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato, Irapuato, p. 114.
- Gonzalez-Prieto, J.M., Rosas-Quijano, R., Dominguez, A., Ruiz-Herrera, J., 2014. The UmGcn5 gene encoding histone acetyltransferase from *Ustilago maydis* is involved in dimorphism and virulence. *Fungal Genet Biol* 71, 86-95.
- Govindaraghavan, M., Anglin, S.L., Osmani, A.H., Osmani, S.A., 2014. The Set1/COMPASS histone H3 methyltransferase helps regulate mitosis with the CDK1 and NIMA mitotic kinases in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 197, 1225-1236.
- Gow, N.A.R., Latge, J.P., Munro, C.A., 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* 5.

- Graff, J., Mansuy, I.M., 2008. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res* 192, 70-87.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M., Goodson, H.V., 2004. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology* 338, 17-31.
- Grunstein, M., Gasser, S.M., 2013. Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Grzenda, A., Lomber, G., Zhang, J.S., Urrutia, R., 2009. Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim Biophys Acta* 1789, 443-450.
- Haber, J.E., 2012. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 33-64.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N., 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews. Genetics* 10, 32-42.
- Hansen, K.R., Hazan, I., Shanker, S., Watt, S., Verhein-Hansen, J., Bahler, J., Martienssen, R.A., Partridge, J.F., Cohen, A., Thon, G., 2011. H3K9me-independent gene silencing in fission yeast heterochromatin by Clr5 and histone deacetylases. *PLoS Genet* 7, e1001268.
- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., Momany, M., 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* 4, 225-229.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., Kamper, J., 2010. The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 6, e1001035.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., Doehlemann, G., 2012. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog* 8, e1002684.
- Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Joyner, P.M., Cichewicz, R.H., 2009. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org Biomol Chem* 7, 435-438.
- Hildmann, C., Riester, D., Schwienhorst, A., 2007. Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Applied microbiology and biotechnology* 75, 487-497.

- Hnisz, D., Schwarzmuller, T., Kuchler, K., 2009. Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 74, 1-15.
- Hoffman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
- Holliday, R., 1961a. The genetics of *Ustilago maydis* *Genetics Research* 2, 204-230.
- Holliday, R., 1961b. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetics Research* 2, 231-248.
- Holliday, R., 1974. *Ustilago maydis*, in: King, R.C. (Ed.), *Handbook of Genetics*. New York: Plenum Press, pp. 575-595.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., Sinclair, D.A., 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Huang, R., Ding, Q., Xiang, Y., Gu, T., Li, Y., 2016. Comparative Analysis of DNA Methyltransferase Gene Family in Fungi: A Focus on Basidiomycota. *Front Plant Sci* 7, 1556.
- Huarte, M., Lan, F., Kim, T., Vaughn, M.W., Zaratiegui, M., Martienssen, R.A., Buratowski, S., Shi, Y., 2007. The fission yeast Jmj2 reverses histone H3 Lysine 4 trimethylation. *J Biol Chem* 282, 21662-21670.
- Huff, J.T., Zilberman, D., 2014. Dnmt1-independent CG methylation contributes to nucleosome positioning in diverse eukaryotes. *Cell* 156, 1286-1297.
- Huh, A., Dubey, A., Kim, S., Jeon, J., Lee, Y.H., 2017. MoJMJ1, Encoding a Histone Demethylase Containing JmjC Domain, Is Required for Pathogenic Development of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Plant Pathol J* 33, 193-205.
- Hung, M.S., Shen, C.K., 2003. Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins and chromatin modification. *Eukaryot Cell* 2, 841-846.
- Ito, M., Koike, A., Koizumi, N., Sano, H., 2003. Methylated DNA-binding proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133, 1747-1754.
- Izawa, M., Takekawa, O., Arie, T., Teraoka, T., Yoshida, M., Kimura, M., Kamakura, T., 2009. Inhibition of histone deacetylase causes reduction of appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Journal of general and applied microbiology* 55, 489-498.

Jahan, S., Davie, J.R., 2015. Protein arginine methyltransferases (PRMTs): role in chromatin organization. *Adv Biol Regul* 57, 173-184.

Janevska, S., Baumann, L., Sieber, C.M.K., Munsterkotter, M., Ulrich, J., Kamper, J., Guldener, U., Tudzynski, B., 2018a. Elucidation of the Two H3K36me3 Histone Methyltransferases Set2 and Ash1 in *Fusarium fujikuroi* Unravels Their Different Chromosomal Targets and a Major Impact of Ash1 on Genome Stability. *Genetics* 208, 153-171.

Janevska, S., Guldener, U., Sulyok, M., Tudzynski, B., Studt, L., 2018b. Set1 and Kdm5 are antagonists for H3K4 methylation and regulators of the major conidiation-specific transcription factor gene ABA1 in *Fusarium fujikuroi*. *Environ Microbiol* 20, 3343-3362.

Jazayeri, A., McAinsh, A.D., Jackson, S.P., 2004. *Saccharomyces cerevisiae* Sin3p facilitates DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1644-1649.

Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Jeon, J., Choi, J., Lee, G.W., Park, S.Y., Huh, A., Dean, R.A., Lee, Y.H., 2015. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Sci Rep* 5, 8567.

Johnsson, A., Xue-Franzen, Y., Lundin, M., Wright, A.P., 2006. Stress-specific role of fission yeast Gcn5 histone acetyltransferase in programming a subset of stress response genes. *Eukaryot Cell* 5, 1337-1346.

Juarez-Montiel, M., Ruiloba de Leon, S., Chavez-Camarillo, G., Hernandez-Rodriguez, C., Villa-Tanaca, L., 2011. Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Rev Iberoam Micol* 28, 69-73.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., Jeltsch, A., 2011. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* 12, 206-222.

Kadamb, R., Mittal, S., Bansal, N., Batra, H., Saluja, D., 2013. Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *Eur J Cell Biol* 92, 237-246.

Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L., 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development* 13, 2570-2580.

Kamper, J., 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 271, 103-110.

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., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B.W., 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444, 97-101.

Kellner, R., Vollmeister, E., Feldbrugge, M., Begerow, D., 2011. Interspecific sex in grass smuts and the genetic diversity of their pheromone-receptor system. *PLoS Genet* 7, e1002436.

Kellogg, E.A., 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol* 125, 1198-1205.

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, 475-481.

Kim, Y.B., Honda, A., Yoshida, M., Horinouchi, S., 1998. *phd1+*, a histone deacetylase gene of *Schizosaccharomyces pombe*, is required for the meiotic cell cycle and resistance to trichostatin A. *FEBS Lett* 436, 193-196.

Klosterman, S.J., Perlin, M.H., Garcia-Pedrajas, M., Covert, S.F., Gold, S.E., 2007. Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Advances in genetics* 57, 1-47.

Krumova, E.Z., Pashova, S.B., Dolashka-Angelova, P.A., Stefanova, T., Angelova, M.B., 2009. Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humicola lutea* under copper exposure. *Process Biochemistry* 44, 288-295.

Kucharczyk, R., Gromadka, R., Migdalski, A., Slonimski, P.P., Rytka, J., 1999. Disruption of six novel yeast genes located on chromosome II reveals one gene essential for vegetative growth and two required for sporulation and conferring hypersensitivity to various chemicals. *Yeast* 15, 987-1000.

Lan, H.H., Sun, R.L., Fan, K., Yang, K.L., Zhang, F., Nie, X.Y., Wang, X.N., Zhuang, Z.H., Wang, S.H., 2016. The *Aspergillus flavus* Histone Acetyl transferase AflGcnE Regulates Morphogenesis, Aflatoxin Biosynthesis, and Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology* 7.

- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L.S., Schuster, M., Tanaka, S., Liang, L., Ludwig, N., Kahmann, R., 2017. *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat Rev Microbiol* 15, 409-421.
- Latham, J.A., Chosed, R.J., Wang, S., Dent, S.Y., 2011. Chromatin signaling to kinetochores: transregulation of Dam1 methylation by histone H2B ubiquitination. *Cell* 146, 709-719.
- Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Guldener, U., Munsterkotter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G., Schirawski, J., 2012. Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell* 24, 1733-1745.
- Laurie, J.D., Linning, R., Wong, P., Bakkeren, G., 2013. Do TE activity and counteracting genome defenses, RNAi and methylation, shape the sex lives of smut fungi? *Plant Signal Behav* 8, e23853.
- Law, J.A., Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204-220.
- Lee, I., Oh, J.H., Shwab, E.K., Dagenais, T.R., Andes, D., Keller, N.P., 2009. HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet Biol* 46, 782-790.
- Leipe, D.D., Landsman, D., 1997. Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic acids research* 25, 3693-3697.
- Li, E., Zhang, Y., 2014. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a019133.
- Li, R., Zhou, S., Li, Y., Shen, X., Wang, Z., Chen, B., 2018. Comparative Methylome Analysis Reveals Perturbation of Host Epigenome in Chestnut Blight Fungus by a Hypovirus. *Front Microbiol* 9, 1026.
- Li, Y., Wang, C., Liu, W., Wang, G., Kang, Z., Kistler, H.C., Xu, J.R., 2011. The HDF1 histone deacetylase gene is important for conidiation, sexual reproduction, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 487-496.
- Liang, L., Liu, Y., Yang, K., Lin, G., Xu, Z., Lan, H., Wang, X., Wang, S., 2017. The Putative Histone Methyltransferase DOT1 Regulates Aflatoxin and Pathogenicity Attributes in *Aspergillus flavus*. *Toxins (Basel)* 9.

Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S., Jacobsen, S.E., 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292, 2077-2080.

Litt, M., Qiu, Y., Huang, S., 2009. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep* 29, 131-141.

Liu, K., Liu, Y., Lau, J.L., Min, J., 2015a. Epigenetic targets and drug discovery Part 2: Histone demethylation and DNA methylation. *Pharmacology and Therapeutics*.

Liu, Y., Liu, N., Yin, Y., Chen, Y., Jiang, J., Ma, Z., 2015b. Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism and multiple stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environ Microbiol* 17, 4615-4630.

Luger, K., 2001. Nucleosomes: Structure and Function. Nature Publishing Group.

Ma, X.J., Lu, Q., Grunstein, M., 1996. A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swe1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10, 1327-1340.

Mann, J.R., 2014. Epigenetics and memigenetics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 1117-1122.

Martin, C., Zhang, Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 838-849.

Martinez-Espinoza, A.D., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., 2002. The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* 35, 1-20.

Martinez-Espinoza, A.D., Leon, C., Elizarraraz, G., Ruiz-Herrera, J., 1997. Monomorphic Nonpathogenic Mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 87, 259-265.

Martinez-Espinoza, A.D., Ruiz-Herrera, J., Leon-Ramirez, C.G., Gold, S.E., 2004. MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol* 49, 274-281.

Martinez-Soto, D., Gonzalez-Prieto, J.M., Ruiz-Herrera, J., 2015. Transcriptomic analysis of the GCN5 gene reveals mechanisms of the epigenetic regulation of virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res* 15.

Matei, A., Doehlemann, G., 2016. Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Curr Opin Microbiol* 34, 60-66.

- McBride, A.E., Weiss, V.H., Kim, H.K., Hogle, J.M., Silver, P.A., 2000. Analysis of the yeast arginine methyltransferase Hmt1p/Rmt1p and its in vivo function. Cofactor binding and substrate interactions. *J Biol Chem* 275, 3128-3136.
- McBride, A.E., Zurita-Lopez, C., Regis, A., Blum, E., Conboy, A., Elf, S., Clarke, S., 2007. Protein arginine methylation in *Candida albicans*: role in nuclear transport. *Eukaryot Cell* 6, 1119-1129.
- McTaggart, A.R., Shivas, R.G., Boekhout, T., Oberwinkler, F., Vanky, K., Pennycook, S.R., Begerow, D., 2016. Mycosarcoma (*Ustilaginaceae*), a resurrected generic name for corn smut (*Ustilago maydis*) and its close relatives with hypertrophied, tubular sori. *IMA Fungus* 7, 309-315.
- McTaggart, A.R., Shivas, R.G., Geering, A.D., Callaghan, B., Vanky, K., Scharaschkin, T., 2012a. Soral synapomorphies are significant for the systematics of the *Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces* complex (*Ustilaginaceae*). *Persoonia* 29, 63-77.
- McTaggart, A.R., Shivas, R.G., Geering, A.D., Vanky, K., Scharaschkin, T., 2012b. A review of the *Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces* complex. *Persoonia* 29, 55-62.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kamper, J., Kahmann, R., 2009. Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 71, 895-911.
- Milliman, E.J., Yadav, N., Chen, Y.C., Muddukrishna, B., Karunanithi, S., Yu, M.C., 2012. Recruitment of Rpd3 to the telomere depends on the protein arginine methyltransferase Hmt1. *PLoS One* 7, e44656.
- Minarovits, J., Banati, F., Szenthe, K., Niller, H.H., 2016. Epigenetic Regulation. *Adv Exp Med Biol* 879, 1-25.
- Mishra, P.K., Baum, M., Carbon, J., 2011. DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11965-11970.
- Molina, L., Kahmann, R., 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19, 2293-2309.
- Morrow, C.A., Fraser, J.A., 2009. Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res* 9, 161-177.
- Munkacsı, A.B., Stoxen, S., May, G., 2007. Domestication of maize, sorghum, and sugarcane did not drive the divergence of their smut pathogens. *Evolution* 61, 388-403.

Munkacsí, A.B., Stoxen, S., May, G., 2008. *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. *Proc Biol Sci* 275, 1037-1046.

Munsterkötter, 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.

Murcia-Garzón, J.E., 2016. Análisis y clasificación molecular de proteínas que remodelan la estructura de la cromatina, Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas, p. 267.

Musselman, C.A., Lalonde, M.E., Cote, J., Kutateladze, T.G., 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1218-1227.

Nadal-Ribelles, M., Mas, G., Millan-Zambrano, G., Sole, C., Ammerer, G., Chavez, S., Posas, F., de Nadal, E., 2015. H3K4 monomethylation dictates nucleosome dynamics and chromatin remodeling at stress-responsive genes. *Nucleic Acids Res* 43, 4937-4949.

Nadal, M., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., 2008. Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 284, 127-134.

Nakazawa, T., Tatsuta, Y., Fujita, T., Nakahori, K., Kamada, T., 2010. Mutations in the *Cc.rmt1* gene encoding a putative protein arginine methyltransferase alter developmental programs in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Curr Genet* 56, 361-367.

Nanney, D.L., 1958. Epigenetic Control Systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44, 712-717.

Nislow, C., Ray, E., Pillus, L., 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol Biol Cell* 8, 2421-2436.

Noma, K., Grewal, S.I.S., 2002. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and promotes maintenance of active chromatin states in fission yeast *PNAS* 99, 16438–16445
O'Donnell, K.L., McLaughlin, D.J., 1984. Postmeiotic Mitosis, Basidiospore Development, and Septation in *Ustilago maydis* *Mycologia* 76, 486-502.

O'Meara, T.R., Hay, C., Price, M.S., Giles, S., Alspaugh, J.A., 2010. *Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host. *Eukaryot Cell* 9, 1193-1202.

Oki, M., Aihara, H., Ito, T., 2007. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem* 41, 319-336.

Palmer, J.M., Bok, J.W., Lee, S., Dagenais, T.R.T., Andes, D.R., Kontoyiannis, D.P., Keller, N.P., 2013. Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. PeerJ 1, e4.

Palmer, J.M., Perrin, R.M., Dagenais, T.R., Keller, N.P., 2008. H3K9 methylation regulates growth and development in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell 7, 2052-2060.

Persoon, D.C.H., 1801. Synopsis methodica fungorum: sistens enumerationem omnium huc usque detectarum specierum, cum brevibus descriptionibus nec non synonymiis et observationibus selectis. Dieterich, H., Gottingae.

Pham, C.D., Yu, Z., Sandrock, B., Bolker, M., Gold, S.E., Perlin, M.H., 2009. *Ustilago maydis* Rho1 and 14-3-3 homologues participate in pathways controlling cell separation and cell polarity. Eukaryot Cell 8, 977-989.

Pham, K.T., Inoue, Y., Vu, B.V., Nguyen, H.H., Nakayashiki, T., Ikeda, K., Nakayashiki, H., 2015. MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) Regulates Global Gene Expression during Infection-Related Morphogenesis. PLoS Genet 11, e1005385.

Pham, K.T.M., Nguyen, H.H., Murai, T., Chuma, I., Tosa, Y., Nakayashiki, H., 2014. Histone H3K4 methyltransferase globally regulates substrate-dependent activation of cell-wall-degrading enzymes in *Magnaporthe oryzae*, J Gen Plant Pathol The Phytopathological Society of Japan and Springer Japan Kobe, Japan, pp. 1-4.

Pikaard, C.S., Mittelsten Scheid, O., 2014. Epigenetic regulation in plants. Cold Spring Harb Perspect Biol 6, a019315.

Puhalla, J.E., 1968. Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Genetics 60, 461-474.

Puhalla, J.E., 1970. Genetic studies of the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. Genetics Research 16, 229-232.

Raduwan, H., Isola, A.L., Belden, W.J., 2013. Methylation of histone H3 on lysine 4 by the lysine methyltransferase SET1 protein is needed for normal clock gene expression. J Biol Chem 288, 8380-8390.

Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J., Hanahan, D., 1988. McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. Nucleic Acids Res 16, 1563-1575.

Ram, A., Klis, F., 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. NATURE PROTOCOLS 1, 2253-2256.

Raman, S.B., Nguyen, M.H., Zhang, Z., Cheng, S., Jia, H.Y., Weisner, N., Iczkowski, K., Clancy, C.J., 2006. *Candida albicans* SET1 encodes a histone 3 lysine 4 methyltransferase that contributes to the pathogenesis of invasive candidiasis. *Mol Microbiol* 60, 697-709.

Rasmussen, K.D., Helin, K., 2016. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev* 30, 733-750.

Redkar, A., Doehlemann, G., 2016. *Ustilago maydis* Virulence Assays in Maize. *bio-protocol* 6, 1-7.

Redkar, A., Hoser, R., Schilling, L., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, V., Doehlemann, G., 2015. A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* Guides Maize Leaf Cells to Form Tumors. *Plant Cell* 27, 1332-1351.

Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R., Kamper, J., 2002. The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. *Molecular microbiology* 46, 1169-1182.

Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R., Strauss, J., 2012. Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* 49, 39-47.

Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N., Strauss, J., 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 76, 1376-1386.

Reynaga-Pena, C.G., Gierz, G., Bartnicki-Garcia, S., 1997. Analysis of the role of the Spitzenkorper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9096-9101.

Richards, E.J., Elgin, S.C., 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489-500.

Richie, D.L., Hartl, L., Aimanianda, V., Winters, M.S., Fuller, K.K., Miley, M.D., White, S., McCarthy, J.W., Latge, J.P., Feldmesser, M., Rhodes, J.C., Askew, D.S., 2009. A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 5, e1000258.

Riggs, A., Porter, T., 1996. Overview of epigenetic mechanisms, in: Russo, V., Martienssen, R.A., Riggs, A. (Eds.), *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 29-45.

- Riquelme, M., Sanchez-Leon, E., 2014. The Spitzenkorper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol* 20, 27-33.
- Rodriguez-Pina, A.L., Juarez-Montiel, M., Hernandez-Sanchez, I.E., Rodriguez-Hernandez, A.A., Bautista, E., Becerra-Flora, A., Lopez-Villegas, E.O., Jimenez-Bremont, J.F., 2019. The *Ustilago maydis* null mutant strains of the RNA-binding protein UmRrm75 accumulate hydrogen peroxide and melanin. *Sci Rep* 9, 10813.
- Rojas-Triviño, A., 2011. *Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Valle, Colombia.
- Rose, N.R., Klose, R.J., 2014. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 1839, 1362-1372.
- Rosler, S.M., Kramer, K., Finkemeier, I., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2016. The SAGA complex in the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*: structure and functional characterization. *Mol Microbiol* 102, 951-974.
- Rothbart, S.B., Strahl, B.D., 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et biophysica acta*, 627-643.
- Rowell, J.B., 1955. Segregation of Sex Factors in a Diploid Line of *Ustilago zaeae* Induced by Alpha Radiation. *Science* 121, 304-306.
- Rowell, J.B., DeVay, J.E., 1954. Genetics of *Ustilago zaeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* 44, 356-362.
- Ruiz-Herrera, J., 2008. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico, Nova Scientia. Universidad De La Salle Bajío, México, pp. 118-135.
- Ruiz-Herrera, J., 2016. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ruiz-Herrera, J., Campos-Góngora, E., 2012. An Introduction to Fungal Dimorphism, in: Ruiz-Herrera, J. (Ed.), *Dimorphic Fungi: Their Importance As Models for Differentiation and Fungal Pathogenesis*. Bentham Science Publishers, Sharjah, United Arab Emirates, pp. 3-15.
- Ruiz-Herrera, J., León, C.G., Guevara-Oivera, L., Cárabez-Trejo, A., 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141, 695-703.
- Ryan, D.P., Sundaramoorthy, R., Martin, D., Singh, V., Owen-Hughes, T., 2011. The DNA-binding domain of the Chd1 chromatin-remodelling enzyme contains SANT and SLIDE domains. *EMBO J* 30, 2596-2609.

Sambrook, J., Rusell, D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSHL Press, New York.

Sanchez-Martinez, C., Perez-Martin, J., 2001. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4, 214-221.

Sarkies, P., Sale, J.E., 2012. Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends in genetics : TIG* 28, 118-127.

Satterlee, T., Cary, J.W., Calvo, A.M., 2016. RmtA, a Putative Arginine Methyltransferase, Regulates Secondary Metabolism and Development in *Aspergillus flavus*. *PLoS One* 11, e0155575.

Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V., Doehlemann, G., 2014. Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Mol Plant Pathol* 15, 780-789.

Schirawski, J., Mannhaupt, G., Munch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rossel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., Muller, O., Winterberg, B., Meyer, E., Ghareeb, H., Wollenberg, T., Munsterkotter, M., Wong, P., Walter, M., Stukenbrock, E., Guldener, U., Kahmann, R., 2010. Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* 330, 1546-1548.

Schnitzler, N., Peltroche-Llacsahuanga, H., Bestier, N., Zundorf, J., Lutticken, R., Haase, G., 1999. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect Immun* 67, 94-101.

Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., Kahmann, R., 1990. The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60, 295-306.

Selker, E.U., 1998. Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9430-9435.

Shahbazian, M.D., Grunstein, M., 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76, 75-100.

Shivas, R.G., Beasley, D., McTaggart, A.R., Vánky, K., 2013. Smut fungi of Australia, Brisbane, Australia.

Shivas, R.G., Beasley, D.R., McTaggart, A.R., 2014. Online identification guides for Australian smut fungi (Ustilaginomycotina) and rust fungi (Pucciniales). *IMA Fungus* 5, 195-202.

Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., Keller, N.P., 2007. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell* 6, 1656-1664.

Slekar, K.H., Henry, S.A., 1995. SIN3 works through two different promoter elements to regulate INO1 gene expression in yeast. *Nucleic Acids Res* 23, 1964-1969.

Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G., Lucchesi, J.C., Allis, C.D., 1998. ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3561-3565.

Smith, K.M., Phatale, P.A., Bredeweg, E.L., Connolly, L.R., Pomraning, K.R., Freitag, M., 2012. Epigenetics of Filamentous Fungi, in: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics*, 2 ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Germany, pp. 1-43.

Smith, K.M., Phatale, P.A., Sullivan, C.M., Pomraning, K.R., Freitag, M., 2011. Heterochromatin is required for normal distribution of *Neurospora crassa* CenH3. *Mol Cell Biol* 31, 2528-2542.

Smith, W.L., Edlind, T.D., 2002. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3532-3539.

Snetselaar, K., McCann, M., 2017. *Ustilago maydis*, the corn smut fungus, has an unusual diploid mitotic stage. *Mycologia* 109, 140-152.

South, P.F., Harmeyer, K.M., Serratore, N.D., Briggs, S.D., 2013. H3K4 methyltransferase Set1 is involved in maintenance of ergosterol homeostasis and resistance to Brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1016-1025.

Southern, E., 2006. Southern blotting. *Nature protocols* 1, 518-525.

Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M.H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T., Fudal, I., 2014. Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet* 10, e1004227.

Steinberg, G., 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* 6, 351-360.

Steinberg, G., Perez-Martin, J., 2008. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* 18, 61-67.

Steinberg, G., Schuster, M., 2011. The dynamic fungal cell. *Fungal Biology Reviews* 25, 14-37.

Sternberg, P.W., Stern, M.J., Clark, I., Herskowitz, I., 1987. Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls. *Cell* 48, 567-577.

Stoll, M., Begerow, D., Oberwinkler, F., 2005. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycol Res* 109, 342-356.

Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Studt, L., Janevska, S., Arndt, B., Boedi, S., Sulyok, M., Humpf, H.U., Tudzynski, B., Strauss, J., 2016. Lack of the COMPASS Component Ccl1 Reduces H3K4 Trimethylation Levels and Affects Transcription of Secondary Metabolite Genes in Two Plant-Pathogenic *Fusarium* Species. *Front Microbiol* 7, 2144.

Studt, L., Schmidt, F.J., Jahn, L., Sieber, C.M., Connolly, L.R., Niehaus, E.M., Freitag, M., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2013. Two histone deacetylases, FfHda1 and FfHda2, are important for *Fusarium fujikuroi* secondary metabolism and virulence. *Appl Environ Microbiol* 79, 7719-7734.

Szyf, M., 2009. The early life environment and the epigenome. *Biochimica et biophysica acta* 1790, 878-885.

Tamaru, H., Selker, E.U., 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277-283.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X., Selker, E.U., 2003. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* 34, 75-79.

Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., Koenig, S., Feussner, K., Feussner, I., Kahmann, R., 2014. A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *Elife* 3, e01355.

Taylor, J.W., Berbee, M.L., 2006. Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* 98, 838-849.

Tollefsbol, T.O., 2011. Advances in epigenetic technology. *Methods Mol Biol* 791, 1-10.

Tribus, M., Galehr, J., Trojer, P., Brosch, G., Loidl, P., Marx, F., Haas, H., Graessle, S., 2005. HdaA, a major class 2 histone deacetylase of *Aspergillus nidulans*, affects growth under conditions of oxidative stress. *Eukaryot Cell* 4, 1736-1745.

Tu, S., Bulloch, E.M., Yang, L., Ren, C., Huang, W.C., Hsu, P.H., Chen, C.H., Liao, C.L., Yu, H.M., Lo, W.S., Freitas, M.A., Tsai, M.D., 2007. Identification of histone demethylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 14262-14271.

Turner, B.M., 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22, 836-845.

Turner, B.M., 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291.

Turner, B.M., 2007. Defining an epigenetic code. *Nature cell biology* 9, 2-6.

Turner, B.M., 2012. The adjustable nucleosome: an epigenetic signaling module. *Trends Genet* 28, 436-444.

Upadhyay, A.K., Cheng, X., 2011. Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques* 67, 107-124.

Valverde, M.E., Hernández-Pérez, T., Paredes-Lopez, O., 2012. Huitlacoche – A 21st Century Culinary Delight Originated in the AztecTimes, in: Tunick, M.H., González de Mejía, E. (Eds.), *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*. American Chemical Society, Washington, DC., p. 344.

Van Speybroeck, L., De Waele, D., Van de Vijver, G., 2002. Theories in early embryology: close connections between epigenesis, preformationism, and self-organization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 981, 7-49.

Veerappan, C.S., Avramova, Z., Moriyama, E.N., 2008. Evolution of SET-domain protein families in the unicellular and multicellular Ascomycota fungi. *BMC Evol Biol* 8, 190.

Vidal, M., Gaber, R.F., 1991. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 6317-6327.

Villota-Salazar, N.A., 2013. Análisis epigenético de la patogenicidad del hongo *Macrophomina phaseolina* en *Phaseolus vulgaris*, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México, p. 134.

Villota-Salazar, N.A., Mendoza-Mendoza, A., González-Prieto, J.M., 2016. Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science* 9, 347-370.

Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., Grunstein, M., 2002. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Molecular cell* 10, 1223-1233.

Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., Feldbrugge, M., 2012. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. FEMS Microbiol Rev 36, 59-77.

Voth, P.D., Mairura, L., Lockhart, B.E., May, G., 2006. Phylogeography of *Ustilago maydis* virus H1 in the USA and Mexico. J Gen Virol 87, 3433-3441.

Waddington, C.H., 1939. An Introduction to Modern Genetics. The MacMillan Company, United States of America.

Waddington, C.H., 2016. Biological development, Encyclopædia Britannica Encyclopædia Britannica, inc. .

Walport, L.J., Hopkinson, R.J., Chowdhury, R., Schiller, R., Ge, W., Kawamura, A., Schofield, C.J., 2016. Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases. Nature Communications 7, 1-12.

Wanat, J.J., Logsdon, G.A., Driskill, J.H., Deng, Z., Lieberman, P.M., Johnson, F.B., 2018. TERRA and the histone methyltransferase Dot1 cooperate to regulate senescence in budding yeast. PLoS One 13, e0195698.

Wang, G., Wang, C., Hou, R., Zhou, X., Li, G., Zhang, S., Xu, J.R., 2012. The AMT1 arginine methyltransferase gene is important for plant infection and normal hyphal growth in *Fusarium graminearum*. PLoS One 7, e38324.

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

Wang, X., Chang, P., Ding, J., Chen, J., 2013. Distinct and redundant roles of the two MYST histone acetyltransferases Esa1 and Sas2 in cell growth and morphogenesis of *Candida albicans*. Eukaryot Cell 12, 438-449.

Wang, Y., Casadevall, A., 1994. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. Infect Immun 62, 3004-3007.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., 2004. Molecular Biology of the Gene. Pearson Education, Benjamin Cummings, San Francisco, United States.

Weber, I., Gruber, C., Steinberg, G., 2003. A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. Plant Cell 15, 2826-2842.

- Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E., Cichewicz, R.H., 2008. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem* 6, 1895-1897.
- Wollenberg, T., Schirawski, J., 2014. Comparative genomics of plant fungal pathogens: the *Ustilago-Sporisorium* paradigm. *PLoS Pathog* 10, e1004218.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Cote, J., Kron, S.J., 2005. Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol* 25, 8430-8443.
- Xin, Q., Gong, Y., Lv, X., Chen, G., Liu, W., 2013. *Trichoderma reesei* Histone Acetyltransferase Gcn5 Regulates Fungal Growth, Conidiation, and Cellulase Gene Expression. *Current microbiology* 67, 580-589.
- Xoconostle-Cazares, B., Specht, C.A., Robbins, P.W., Liu, Y., Leon, C., Ruiz-Herrera, J., 1997. Umchs5, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 22, 199-208.
- Xue-Franzen, Y., Johnsson, A., Brodin, D., Henriksson, J., Burglin, T.R., Wright, A.P., 2010. Genome-wide characterisation of the Gcn5 histone acetyltransferase in budding yeast during stress adaptation reveals evolutionarily conserved and diverged roles. *BMC Genomics* 11, 200.
- Yang, K., Liang, L., Ran, F., Liu, Y., Li, Z., Lan, H., Gao, P., Zhuang, Z., Zhang, F., Nie, X., Kalayu Yirga, S., Wang, S., 2016. The DmtA methyltransferase contributes to *Aspergillus flavus* conidiation, sclerotial production, aflatoxin biosynthesis and virulence. *Sci Rep* 6, 23259.
- Yu, M.C., Lamming, D.W., Eskin, J.A., Sinclair, D.A., Silver, P.A., 2006. The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin. *Genes Dev* 20, 3249-3254.
- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., Li, B., 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res* 21, 564-578.
- Zacchi, L.F., Schulz, W.L., Davis, D.A., 2010. HOS2 and HDA1 encode histone deacetylases with opposing roles in *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS One* 5, e12171.
- Zemach, A., Zilberman, D., 2010. Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Curr Biol* 20, R780-785.
- Zeng, W., Ball, A.R., Jr., Yokomori, K., 2010. HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics* 5, 287-292.

Zhang, K., Lin, W., Latham, J.A., Riefler, G.M., Schumacher, J.M., Chan, C., Tatchell, K., Hawke, D.H., Kobayashi, R., Dent, S.Y., 2005. The Set1 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell* 122, 723-734.

Zhang, L., Chen, W., Iyer, L.M., Hu, J., Wang, G., Fu, Y., Yu, M., Dai, Q., Aravind, L., He, C., 2014. A TET homologue protein from *Coprinopsis cinerea* (CcTET) that biochemically converts 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, and 5-carboxylcytosine. *J Am Chem Soc* 136, 4801-4804.

Zhang, Y.Q., Rao, R., 2010. Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence* 1, 551-554.

Zhang, Z., Wen, J., Li, J., Ma, X., Yu, Y., Tan, X., Wang, Q., Liu, B., Li, X., Li, Y., Gong, L., 2018. The evolution of genomic and epigenomic features in two *Pleurotus* fungi. *Sci Rep* 8, 8313.

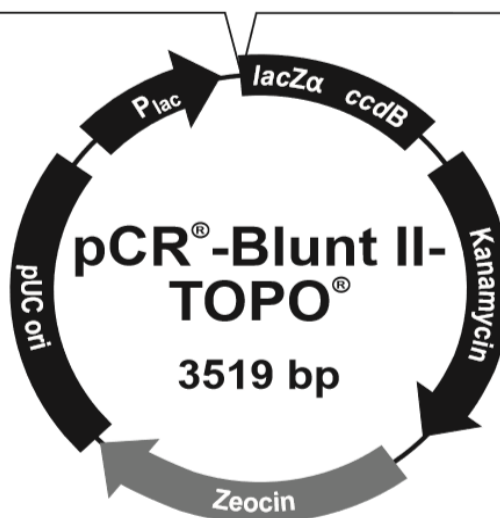
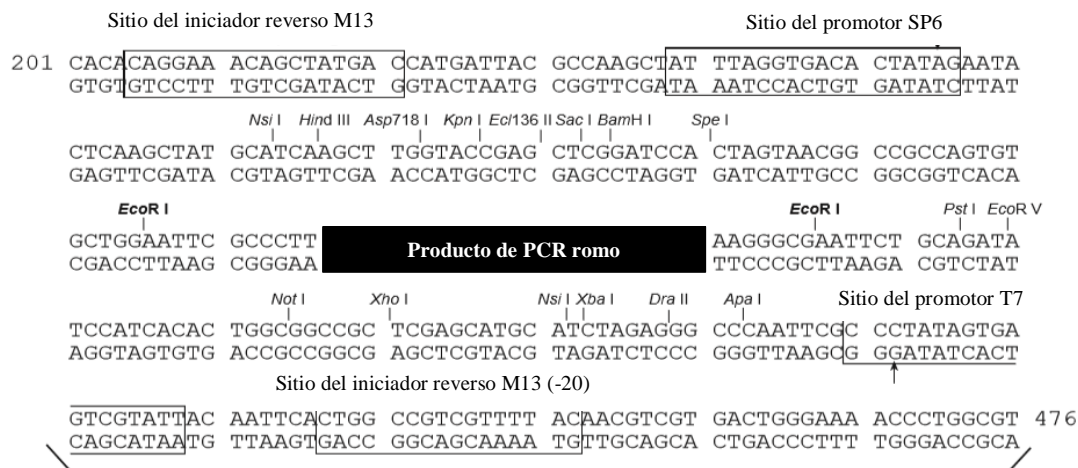
Zhi, Q.Q., Li, J.Y., Liu, Q.Y., He, Z.M., 2017. A cytosine methyltransferase ortholog dmtA is involved in the sensitivity of *Aspergillus flavus* to environmental stresses. *Fungal Biol* 121, 501-514.

Zuther, K., Mayser, P., Hettwer, U., Wu, W., Spitteller, P., Kindler, B.L., Karlovsky, P., Basse, C.W., Schirawski, J., 2008. The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 68, 152-172.

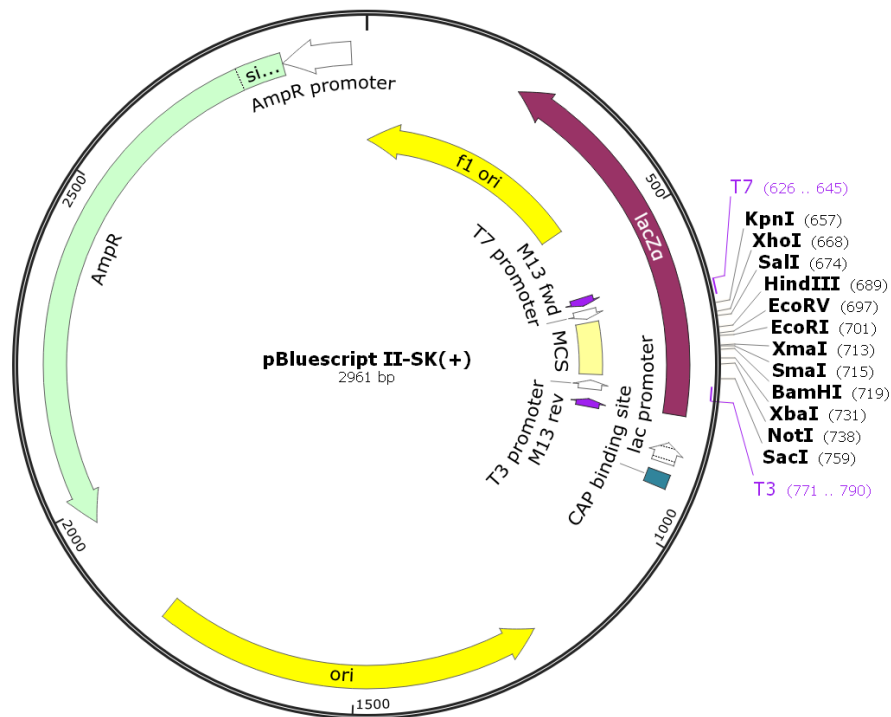
11 APÉNDICE

1. Villota-Salazar, N.A., Mendoza-Mendoza, A., González-Prieto, J.M., 2016. Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science* 9, 347-370.

2. Plásmido pCR Blunt II TOPO, Invitrogen.



3. Plásmido pBluescript II-SK(+).



4. Productos derivados del presente trabajo y colaboraciones adicionales.

Presentaciones en congresos y eventos:

- Cartel: Analysis of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. pathogenicity genes considering several epigenetic backgrounds. Nubia Andrea Villota-Salazar, Sanjuana Hernández-Delgado y Juan Manuel González-Prieto. XXX Congreso Nacional de Bioquímica. 2014.
- Cartel: Epigenetic analysis of the pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Nubia Andrea Villota-Salazar, Sanjuana Hernández-Delgado, Juan Manuel González-Prieto. 1st Biotechnology World Symposium. 2014.
- Ponencia: Epigenética: Conceptos y Perspectivas. Nubia Andrea Villota Salazar. Universidad del Valle de México, Campus Reynosa. 2014.

- Cartel: Acetilación de las histonas en la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. sobre *Phaseolus vulgaris* L. Nubia Andrea Villota-Salazar, Sanjuana Hernández-Delgado y Juan Manuel González-Prieto. XXXIX Congreso Nacional de Microbiología. 2015.
- Profesora invitada: Análisis epigenético de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* en *Phaseolus vulgaris*. Nubia Andrea Villota Salazar. Curso de Maestría: Principios de Bioinformática. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2015.
- Cartel: *In silico* analysis of the conservation of histone deacetylase HOS2 in fungi. Nubia Andrea Villota Salazar, Artemio Mendoza Mendoza, Juan Manuel González Prieto. XI Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. 2015.
- Cartel: Elaboración de casetes de interrupción para la delección de genes que codifican para proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina en el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota Salazar, Artemio Mendoza Mendoza, Juan Manuel González Prieto. Congreso Binacional de Temas Biotecnológicos. 2016.
- Ponencia: Regulación epigenética en los hongos fitopatógenos. Nubia Andrea Villota Salazar. 1er Simposium Internacional de Microbiología Aplicada. Universidad Autónoma de Tamaulipas. 2016.
- Cartel: Implementation of a PCR-based system for generation of mutants in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota Salazar, Artemio Mendoza Mendoza, Juan Manuel González Prieto. XXXI Congreso Nacional de Bioquímica. 2016.
- Ponencia: El código epigenético en el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Nubia Andrea Villota Salazar, Víctor Hugo Ramos García, Sanjuana Hernández Delgado y Juan Manuel González Prieto. 9° Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria. 2017.
- Cartel: Implementación de un sistema basado en PCR para la generación de mutantes del hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. 9° Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria. 2017.
- Cartel: Análisis *in silico* de la conservación de la proteína desacetilasa de histonas Hos2 en hongos. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. 9° Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria. 2017.

- Ponencia: Estudio de la relación entre la función del gen *SET1* y la virulencia del hongo *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. XII Congreso de Biotecnología Chiapas 2017. 2017.
- Cartel: Deletion of a histone methyltransferase causes morphological alterations in the phytophogenic fungus *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. XII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. 2017.
- Ponencia: La interrupción de un gen que codifica para una metiltransferasa de histonas en el hongo *Ustilago maydis*, ocasiona alteraciones en su morfología, resistencia al estrés y virulencia. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. 10° Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria. 2018.
- Cartel: Desarrollo de un sistema de transformación genética para promover la recombinación homóloga en *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Víctor Hugo Ramos García, Nubia Andrea Villota Salazar, Diana Verónica Cortes Espinosa, Juan Manuel González Prieto. 10° Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria. 2018.
- Cartel: The inhibition of the histone deacetylases and its effect on the morphology and virulence of the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Víctor Hugo Ramos García, Nubia Andrea Villota Salazar, Diana Verónica Cortes Espinosa, Juan Manuel González Prieto. 72nd Annual Meeting of the Subtropical Agriculture and Environments Society. 2018.
- Profesora invitada: Epigenética. Nubia Andrea Villota Salazar. Curso de Maestría: Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica. IPN. 2018.
- Profesora invitada: Epigenética en hongos. Nubia Andrea Villota Salazar. Curso de Maestría: Micotecnología. Centro de Biotecnología Genómica. IPN. 2018.
- Cartel: Deletion of a gene encoding for a chromatin remodeling protein causes increased stress sensibility and reduction of virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota Salazar, Artemio Mendoza Mendoza, Juan Manuel González Prieto. XXXII Congreso Nacional de Bioquímica. 2018.
- Cartel: The role of the histone deacetylases in the morphology and virulence of the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid). Víctor Hugo Ramos García, Nubia Andrea Villota Salazar, Diana Verónica Cortes Espinosa, Juan Manuel González Prieto. XXXII Congreso Nacional de Bioquímica. 2018.

Reconocimientos:

- **Primer lugar.** Cartel: Epigenetic analysis of the pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Nubia Andrea Villota-Salazar, Sanjuana Hernández-Delgado, Juan Manuel González-Prieto. 1st Biotechnology World Symposium. 2014.
- **Primer lugar.** Cartel: Análisis *in silico* de la conservación de la proteína desacetilasa de histonas Hos2 en hongos. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. 9° Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria. 2017.
- **Primer lugar.** Mejor trabajo oral en el área de Biotecnología Agrícola y Vegetal. Ponencia: Estudio de la relación entre la función del gen *SET1* y la virulencia del hongo *Ustilago maydis*. Nubia Andrea Villota-Salazar, Artemio Mendoza-Mendoza y Juan Manuel González-Prieto. XII Congreso de Biotecnología Chiapas 2017. 2017.

Artículos en preparación:

- Inhibition of histone deacetylases causes developmental alterations and a reduction in virulence in the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Nubia Andrea Villota-Salazar, Víctor Hugo Ramos-García, Ángel Salazar-Bravo, Sanjuana Hernández-Delgado, Juan Manuel González-Prieto.
- Effects of histone deacetylase inhibitors on the growth and dimorphic transition of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Martha V. Roa-Cordero, Christian A. Arenas-Sepúlveda, María C. Herrera-Plata, Sandra M. Leal-Pinto, Nubia A. Villota-Salazar, Juan M. González-Prieto.
- Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and sodium butyrate, affect the growth, morphology and virulence of the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Víctor Hugo Ramos-García, Nubia Andrea Villota-Salazar, Diana Verónica Cortés-Espinosa, y Juan Manuel González-Prieto.
- Dos artículos sobre el presente trabajo.