

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

---



**“Obtención de una biblioteca substractiva de cDNA en la infección temprana de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana*”**

---

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**Mario Iván Alemán Duarte**

---

Las Agujas, Zapopan Jalisco. Agosto de 2009

“Obtención de una biblioteca substractiva de cDNA en la infección temprana de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana*”

---

P R E S E N T A  
Mario Iván Alemán Duarte



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**  
*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología*

1408/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARIO IVAN ALEMAN DUARTE

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **"Obtención de una biblioteca subtractiva de cDNA en la infección temprana de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana*"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la **Dra. Lucila Méndez Morán**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 24 de noviembre del 2008.



DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIATURA EN BIOLÓGIA



M en C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

**Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha**

Presidente del Comité de Titulación.

Licenciatura en Biología.

CUCBA.

**PRESENTE**

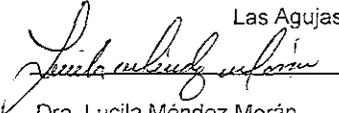
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis, opción Tesis con el título: "Obtención de una biblioteca substractiva de cDNA en la infección temprana de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana*" que realizó el pasante **Mario Iván Alemán Duarte** con número de código **B04008936** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Mario Iván Alemán Duarte

Las Agujas, Zapopan., 26 de Noviembre del 2008

  
Dra. Lucila Méndez Morán

Director/a del trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Carla Vanessa Sánchez Hernández		27/08/09
Gil Virgen Calleros		26/08/09
M. Olivia Rodríguez Alcántar		27/08/09
Supl.  Anne Santerre		27/08/09



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA EN EL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LUCILA MÉNDEZ MORÁN. EL FINANCIAMIENTO DE ESTE TRABAJO, ASÍ COMO EL APOYO EN FORMA DE TESIS DE LICENCIATURA, FUERON OTORGADOS POR EL PROYECTO CB-2007/79530 DE CONACyT

## *DEDICATORIAS*

*A mis padres y mi tío Raúl*

*Por su esfuerzo y dedicación constante  
en enseñarme a construir mis sueños día a día*

*A mis hermanas  
Claudia y Marisol, porque crecer junto a ellas  
me enseñó a dar siempre lo mejor de mí.*

*A Francisco de la Torre*

*Por su compañía*

*Que el invierno nos encuentre juntos,  
Que todos los inviernos que estén  
por venir, sigamos juntos.*

# *AGRADECIMIENTOS*

## **A la Dra. Lucila Méndez Morán**

Por permitirme aprender en su laboratorio, por cada uno de sus consejos, por todo el apoyo que siempre me brindó desde que decidí formar parte de su equipo de trabajo, mi más grande agradecimiento y admiración.

## **A la Dra. Julia Zañudo Hernández**

Por su apoyo incondicional durante mi paso por la licenciatura, por su consejos y ayuda.

## **A cada uno de mis sinodales**

A las Doctoras Carla Sánchez, Anne Santerre, Olivia Rodríguez y al Dr. Gil Robles, por sus consejos y atención en la culminación de este trabajo.

## **A mis compañeros de Laboratorio**

A Sara, Gisela, Apatzingan, Isabel, Anaira, Ulises, Dulce, Arely y Laura porque compartir con ellos el trabajo resultó mas agradable y sencillo, porque todos y cada uno, siempre aportaron algo a mi formación profesional y personal, porque entre ellos encontré colegas y excelentes amigos.

## **A mis otros Hermanos**

Luis Enrique Cerda Murillo, Constantino Martínez Salazar y Alfonso Madrigal Munive por compartir conmigo toda una vida, desde la niñez, hasta el éxito profesional, por aceptarme sin condición, por que muchos de mis éxitos se los debo a ustedes, GRACIAS porque son los hermanos que siempre quise tener.

## **A “Tiky”**

Porque si alguien es responsable de cada uno de ms éxitos eres tú, porque me has enseñado la mayoría de los trucos que sé, porque me enseñaste que lo más importante de la vida, no es la meta, si no el camino a recorrer.

### **A mis mejores amigos**

Roberto, Judith, Sara, Daniel, Adriana, Mariana, Gustavo, Mariana (corazón), Anaira porque el paso de la universidad fue la mejor experiencia de mi vida al compartirla con ustedes.

### **A cada uno de mis maestros**

Porque en cada nivel educativo he encontrado aquel que influye en mi vida para siempre, a Pepe, Ariel, Gaby, Carlos Serrano, Luis Burgos y cada uno de los que logré aprender algo de si.

### **A la universidad de Guadalajara**

Por permitirme trazar mi carrera profesional en sus aulas y porque siempre me a brindado un apoyo incondicional para lograr mis proyectos profesionales, por el apoyo para ir a Alemania.

### **A mis tíos Amador y Gloria**

Porque el tiempo en que viví con ellos siempre se ocuparon de mí, y de cualquier cosa que me hiciera falta para facilitar mi paso en la universidad, por el cariño que se que existe y porque pase lo que pase, serán siempre mi Tíos.

### **A Lorena Salceda**

Chaparrita sabes que eres una persona muy importante para mí, que te estimo demasiado, y que lamento que las cosas hayan resultado diferentes para nosotros, gracias por todo tu apoyo.

A todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida en algún momento, porque sé que sin lugar a duda son parte de esta meta...

....a todos ustedes infinitas GRACIAS!

*Mario Iván Alemán Duarte*

# ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS .....	11
ÍNDICE DE FIGURAS .....	12
INDICE DE TABLAS .....	13
RESUMEN .....	14
<b>2. MARCO TEORICO .....</b>	<b>18</b>
2.1. Generalidades de hongos .....	18
2.1.1. Hongos Basidiomycota .....	18
2.2. Generalidades de <i>Ustilago maydis</i> (DC) Corda .....	19
2.1.2. <i>Ustilago maydis</i> como modelo de estudio .....	20
2.2. Generalidades de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heinh .....	21
2.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio .....	22
2.3. Pato sistema <i>Ustilago maydis</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
2.4. Genes involucrados en patogénesis de <i>Ustilago maydis</i> .....	23
2.5. Sistemas diseñados para el análisis de expresión diferencial .....	26
2.5.1. Hibridación substractiva .....	26
2.6. Bioinformática .....	28
2.6.1. Herramientas Bioinformáticas .....	28
2.6.2. Diseño de Oligonucleótidos .....	30
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. Objetivo general .....	33
4.2. Objetivos específicos .....	33
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
5.1. Material biológico y condiciones de cultivo .....	34
5.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heinh .....	34
5.1.2. <i>Ustilago maydis</i> (DC) Corda .....	34
5.1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	35
5.2. Inoculación de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Ustilago maydis</i> .....	36
5.3. Manipulación de ácidos nucleicos .....	36
5.3.1. Aislamiento de ARN total .....	36
5.3.2. Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	37
5.3.3. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> .....	38
5.3.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....	39

5.4. Obtención de la biblioteca mediante Hibridación Substractiva .....	39
5.5. Vector para <i>Escherichia coli</i> .....	40
5.5.1. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	40
5.6. Almacenamiento de la biblioteca substractiva .....	41
5.7. Electroforesis en geles de agarosa .....	41
5.8. Secuenciación .....	42
5.9. Análisis bioinformático .....	42
5.10. Análisis de expresión por RT-PCR de un gen diferencial .....	43
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
6.1. Escrutinio de clones.....	44
6.1.1. Selección de clonas positivas y porcentaje de transformación .....	44
6.1.2. Verificación de clonas positivas por presencia de plásmidos.....	44
6.1.3. Verificación de la presencia y tamaño de insertos .....	44
6.2. Análisis Bioinformático de secuencias.....	45
6.2.1. Secuenciación .....	45
6.2.2. Análisis BLAST <sup>n</sup> .....	45
6.2.3. Análisis BLAST <sup>x</sup> .....	45
6.2.4. Secuencias con identidad al genoma de <i>Ustilago maydis</i> .....	46
6.3. Análisis bioinformático del gen <i>Umf1</i> (3-fitasa) de <i>Ustilago maydis</i> .....	46
6.3.1. Diseño de oligonucleótidos específicos.....	48
6.4. Análisis de expresión por RT-PCR del gen <i>Umf1</i> de <i>Ustilago maydis</i> .....	48
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>9. PERSEPECTIVAS .....</b>	<b>57</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>58</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosin mono fosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNasa	Ribonucleasa
BSA	Albúmina bovina
DEPC	Diethylpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfatado
dpg	Días posteriores a la germinación
DTT	Ditioteritol
EDTA	Ácido etilenglicolaminotetraacético
hpi	Horas posteriores a la inoculación
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosida
Kb	Kilo pares de bases
MAPK	Proteínas Cinasas activadas por Mitógeno
pb	Pares de bases
p/v	peso-volumen
Rpm	revoluciones por minuto
SDS	Laurilsulfatosódico
TA	Temperatura ambiente
Tm	Temperatura de alineamiento
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Luz ultravioleta
Vol	volumen
v/v	volumen-volumen
Xgal	Bromocloroindol $\beta$ -D-galactósido

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Diagrama de las estructuras infectivas de un hongo Biotrófico	20A
<b>Figura 2.</b> Diferentes aspectos de <i>Ustilago maydis</i>	20A
<b>Figura 3.</b> Fases del ciclo celular de <i>Ustilago maydis</i>	20B
<b>Figura 4.</b> Aspectos morfológicos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20B
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de algunos genes involucrados en la patogénesis de <i>Ustilago maydis</i>	25A
<b>Figura 6.</b> Secuencia de los Adaptadores 1 y 2R	27A
<b>Figura 7.</b> Esquema del proceso de substracción por PCR en la metodología de Hibridación Substractiva	27A
<b>Figura 8.</b> Esquema que muestra la secuencia de pasos a seguir por la técnica de Hibridación Substractiva	27B
<b>Figura 9.</b> Esquema del vector de clonación pDrive (Qiagen)	40A
<b>Figura 10.</b> Clonas obtenidas por Hibridación Substractiva del patosistema <i>Ustilago maydis</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i> a las 72 hpi.	44A
<b>Figura 11.</b> Representación gráfica de clonas obtenidas por Hibridación Substractivas	44A
<b>Figura 12.</b> Distribución porcentual de los resultados de transformación de las clonas obtenidos en el banco Substractivo	44B
<b>Figura 13.</b> Gráfico de porcentajes obtenidos sobre los resultados de las clonas confirmadas con presencia de plásmidos por PCR	44B
<b>Figura 14.</b> Verificación de la presencia de ADN plasmídico	44C
<b>Figura 15.</b> Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.2% en donde se muestra el tamaño de los fragmentos clonados determinados por PCR	44C
<b>Figura 16.</b> Comparación del tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR y análisis electroforético en geles de agarosa.	47A
<b>Figura 17.</b> Obtención y escrutinio de las secuencias obtenidas con el fin de obtener al fragmento clonado	47A
<b>Figura 18-A.</b> Diagrama que representa la cantidad de secuencias y genes	

diferentes que presentan identidad con el genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizando la herramienta BLAST'n	47B
<b>Figura 18-B.</b> Diagrama que representa a la cantidad de secuencias y genes diferentes que presentan identidad con el genoma de <i>Ustilago maydis</i> obtenidos mediante BLAST'n	47B
<b>Figura 19-A.</b> Diagrama que representa la cantidad de secuencias y el total de genes representados que fueron obtenidos mediante BLAST'x, que tienen identidad a genes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47B
<b>Figura 19-B.</b> Diagrama que representa la cantidad de secuencias y el total de genes representados que fueron obtenidos mediante BLAST'x, que tienen identidad a genes de <i>Ustilago maydis</i>	47B
<b>Figura 20.</b> Gráfica que compara la distribución porcentual de secuencias analizadas con el algoritmo BLAST'n y BLAST'x con un error de $1e^{-3}$ .	47C
<b>Figura 21</b> Distribución de las categorías funcionales de las proteínas correspondientes a <i>Ustilago maydis</i> en base al programa FUNCAT de la base de datos MIPS	47C
<b>Figura 22</b> Alineamiento de nucleótidos para el gen <i>Umf1</i> y la clona U1H12	47E
<b>Figura 23.</b> Alineamiento múltiple de varias fitas	47F
<b>Figura 24.</b> Árbol filogenético que muestra la relación de parentesco del gen <i>Umf1</i> de <i>Ustilago maydis</i> con otras secuencias de fitas de diversos organismos	47F
<b>Figura 25.</b> Alineamiento entre los oligonucleótidos diseñados y la secuencia del gen <i>Umf1</i> de <i>Ustilago maydis</i>	48A
<b>Figura 26.</b> Análisis de expresión por RT-PCR del gen <i>Umf1</i>	48A
<b>Figura 27.</b> Estructura tridimensional y química del ácido fítico	55A
<b>Figura 28.</b> Defosforilación del ácido fítico por la 3-fitasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55A

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Secuencias con identidad al genoma de <i>Ustilago maydis</i>	47D
<b>Tabla 2.</b> Secuencias homologas a <i>Umf1</i> con mayor porcentaje de identidad utilizada para posteriores alineamientos	47E

## RESUMEN

*Ustilago maydis* (DC) Corda, hongo causante de la enfermedad conocida como carbón común o “huitlacoche” (Bolker, 2001) y *Arabidopsis thaliana* L., planta modelo por excelencia (Meyerowitz, 1987), integran el patosistema utilizado para el estudio de la interacción planta-patógeno y análisis de factores de virulencia de Ustilaginales (Méndez-Morán, 2004). Con el fin de conocer los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de *U. maydis* en *A. thaliana* se construyó un banco de expresión diferencial a las 72 hpi, usando la técnica “Hibridación Substractiva” (SH) siguiendo las instrucciones del proveedor (CLONTECH®). Los fragmentos obtenidos fueron enriquecidos por PCR y clonados en un vector de clonación T/A (pDrive); para la transformación se utilizó células competentes TOP10 F' de *Escherichia. coli*. Se obtuvieron 181 clonas positivas (63% de transformantes). El ADN plasmídico de algunas clonas positivas fue aislado; la calidad y cantidad de ADN se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt, los cuales fueron visualizados con luz UV. Posteriormente se verificó la presencia de insertos utilizando PCR, los fragmentos presentaron un tamaño entre 100 y 1000 pb. Se seleccionaron algunos de estos plásmidos (144, 79.5 % de las clonas analizadas) y fueron secuenciados. Mediante el análisis comparativo de secuencias con el algoritmo “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (Altschul y cols., 1997), se determinó la identidad de los fragmentos clonados. Entre los fragmentos analizados se encontró genes con similitud tanto a *U. maydis* como *A. thaliana*, en el caso de *U. maydis* se localizó algunos genes con relación al proceso de patogénesis que codifican para: Una D-arabinitol 2-deshydrogenasa, Proteína de choque térmico Hsp70, C-14 sterol reductasa (Erg24), Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) y Hexanquifosfohidrolaza ácida (Fitasa). Este último gen fue sometido a un análisis bioinformático más detallado, el cual demostró que el fragmento pertenece al gen *Umf1* que tiene similitud con una Hexanquifosfohidrolaza ácida, encargada de hidrolizar el ácido fítico. Se construyeron oligonucleótidos específicos para amplificar una región conservada del gen, que permitió seguir su expresión por RT-PCR durante el proceso infectivo, los resultados sugieren un aumento en la expresión de

este gen a partir de las 72 hpi incrementándose conforme avanza el tiempo de infección.

En resumen se concluye que la biblioteca substractiva construida a las 72 hpi es significativa y permitió localizar nuevos genes expresados diferencialmente a los anteriormente reportados a las 24 y 96 hpi, utilizando el mismo patosistema. Además se demostró la expresión diferencial de genes relacionados al proceso patogénico de *U.maydis* tal es el caso de una 3-fitasa ácida (*Umf1*).

## 1. INTRODUCCIÓN

Muchos organismos considerados como “Modelos Experimentales” han sido investigados con el fin de obtener información que pueda ser generalizada a otras especies (Serrano-Cartagena, 1998), principalmente en el estudio de patogénesis, en donde se han podido definir a nivel molecular (Schneider y Shahabuddin, 2000) interacciones complejas entre factores producidos por un agente infeccioso y los mecanismos de defensa utilizados por el huésped (Pradel y Ewbank, 2004), estos organismos modelos se caracterizan por tener un genoma reducido y ser susceptibles a la acumulación e integración de la información genética. Entre los modelos fúngicos más utilizados encontramos: *Aspergillus nidulans*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* *Sacharomyces cerevisiae*, y recientemente *Ustilago maydis* (Maheshwari, 2000).

En los últimos 15 años *U. maydis* ha sido el modelo fúngico más utilizado en estudios biológicos y genéticos (Bolker, 2001). Esta especie de hongo es biotrófica por lo que necesita un huésped para completar su ciclo sexual; considerado como patógeno natural del maíz (*Zea mays* L.) y causante de la enfermedad conocida como carbón común o “huitlacoche” (Bolker, 2001; Kahmann y Kämper, 2004). Con anterioridad se ha reportado el uso de huéspedes alternativos no naturales para *U. maydis* (León-Ramírez, 2004). El patosistema no natural integrado por *Ustilago maydis*-*Arabidopsis thaliana* demostró ser un modelo útil para el estudio de la interacción planta-patógeno, con la finalidad de caracterizar genes implicados en el proceso de patogenicidad con mayor facilidad que en el huésped natural (Méndez-Morán y cols., 2005).

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares implicados en la interacción de *Ustilago maydis*-*Arabidopsis thaliana*, en el presente trabajo se construyó un banco de expresión diferencial de ADNc en la infección temprana (72 hpi), teniendo como finalidad que los resultados de este trabajo puedan ser extrapolados con otros hongos de importancia ya sea médica o agronómica, tal es el caso de hongos dimórficos y aquellos causantes de carbones en cultivos de importancia económica,

por ejemplo *Ustilago hordei* (Pers.) Lagerh, *Ustilago titorici* (Pers.) Rostr., *Ustilago avenae* (Pers.) Rostr., entre otros.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Generalidades de hongos

Los hongos son organismos eucariontes heterótrofos que divergieron de un ancestro común flagelado hace aproximadamente 1,000 millones de años, el cual compartía características con células eucarióticas animales (Klaus y cols., 2000; Buckley, 2007). Se encuentran agrupados en dos reinos Straminipila y Eumycota (Burnett, 2003). El primero de ellos son hongos imperfectos (pseudohongos) y su fase vegetativa es predominantemente diploide, se reproducen por zoosporas biflageladas y su pared celular está compuesta por celulosa ( $\beta$ -1,4 glucano) (Cavalier-Smith, 2006). Los Eumycota (hongos verdaderos) son organismos predominantemente haploides que poseen paredes celulares engrosadas principalmente constituidas por quitina, (1,3)- $\beta$  glucano o manana (Maheshwari, 2000). Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son de gran importancia ecológica ya que degradan hasta un 50% de la materia vegetal y animal muerta (Buckley, 2007). Los podemos encontrar de forma saprófita, simbiótica y parásita, siendo estos últimos los que causan una gran cantidad de enfermedades tanto en animales como en plantas (Herrera y Ulloa, 1998).

Los Eumycota se subdividen en 8 filums: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota y Microsporidia (Hibbett y cols., 2007).

#### 2.1.1. Hongos Basidiomycota

Dentro de éste filum se encuentran clasificadas 30,000 especies, el 37% de ellas ubicadas dentro del reino Eumycota (Kirk y cols., 2001). Principalmente son dimórficos y presentan células haploides en la fase de levadura que son sexualmente compatibles, mientras que en la fase de micelio sus hifas son septadas y dicarióticas. Es un grupo muy inconsistente pues podemos encontrar especies unicelulares o pluricelulares, sexuales o asexuales, terrestres o acuáticas, su principal característica, y que todos tienen en común, es la formación del basidio (célula

especializada donde se lleva a cabo la cariogamia [fusión nuclear] y la meiosis formando cuatro basidiosporas haploides) (Ingold, 1991).

Posee tres grandes divisiones: 1) Pucciniomycotina que incluye a los hongos conocidos como royas (Pucciniales) y otros taxones (Swann y cols., 2001; Aime y cols., 2006); 2) Ustilaginomycotina que incluye a los carbones (Ustilaginales) entre otros (Bauer y cols., 2001; Begerow y cols., 2006); y 3) Agaricomycotina que incluye a las setas (Agaricomycetes), mucilaginosos (Auriculariales, Dacrymycetales, Tremellales) y otros mas (Hibbett y Thorn, 2001; Swann y Taylor, 1995; Wells y Bandoni, 2001; Hibbett, 2006). Los Wallemiomycetes y Entorrhizomycetes (anteriormente clasificados dentro de los Ustilaginomycotina [Bauer y cols., 2001]) están clasificados temporalmente dentro de los Basidiomycota aunque con mucha incertidumbre (Matheny y cols. 2006; Hibbett y cols., 2007).

## 2.2. Generalidades de *Ustilago maydis* (DC) Corda

*Ustilago maydis* es un basidiomiceto (Figura 1) que de manera natural infecta al maíz (*Zea mays*) y a su probable progenitor el “teocintle” (*Zea mays sp. parviglumis*), cuya infección produce la enfermedad conocida como “carbón común” o “huitlacoche” (en Náhuatl). Los principales síntomas de la infección de *U. maydis* en maíz son: clorosis (amarillamiento del tejido) en las áreas infectadas, acumulación de antocianinas (pigmento color violeta), necrosis (muerte del tejido), así como hiperplasia e hipertrofia (tumores) en los órganos infectados (Basse y Steinberg, 2004) (Figura 2). Los tejidos meristemáticos de la planta son susceptibles a la infección por *U. maydis*, dando como resultado el desarrollo de agallas compuestas de células anormales del huésped y esporas del hongo (Snetselaar y Mims, 1993). En condiciones naturales los tumores ocurren predominantemente en los órganos sexuales (espigas y mazorcas) los cuáles pueden contener más de 200 billones de esporas (Basse y cols., 2004). En la germinación, las esporas se someten a meiosis y producen la fase haploide (Banuett, 1995).

*U. maydis* es un hongo dimórfico, es decir posee múltiples transiciones morfológicas durante el desarrollo patogénico (Figura 3). Crece en su fase haploide como levadura de tipo saprófita, mientras que en el desarrollo sexual, la fusión de

dos células haploides resultan en un dicarion filamentosos (Christensen, 1963) que invade las células de la planta por medio de una estructura llamada apresorio, dicho proceso ocurre en el hospedero, necesario para llevar a cabo la infección y la culminación de su ciclo de vida (Basse y Steinberg, 2004).

### **2.1.2. *Ustilago maydis* como modelo de estudio**

Actualmente *U. maydis* es el sistema modelo más ampliamente utilizado para develar los mecanismos moleculares de patogenicidad en hongos (Bölker, 2001; Basse y cols., 2004; Kahmann y Kämper, 2004). Algunas de las características que hacen atractivo a *U. maydis* son: a) la existencia de una fase haploide, que permite su manejo por técnicas microbiológicas comunes; b) la posibilidad de construir diploides bajo condiciones de laboratorio, lo que hace factible el realizar análisis de dominancia y complementación; c) la disponibilidad de técnicas de transformación con ADN exógeno; d) la capacidad de completar su ciclo de vida en plantas jóvenes de maíz de pocas semanas de edad; e) la posibilidad de estudiar la transformación dimórfica por manipulación del pH externo (Bölker, 2001; Méndez-Morán y cols., 2005), y muy particularmente, el hecho de que su genoma esté secuenciado y disponible. Dichas características lo hacen útil como modelo general para el estudio de las interacciones planta-hongo (Banuett, 1992; 1995; 2002; Ruiz-Herrera y cols., 2000; Bölker, 2001).

El genoma de *U. maydis* fue secuenciado y dado de alta en la internet en el 2004, es el segundo fitopatogeno en ser secuenciado y uno de los 15 genomas fúngicos que actualmente están disponibles en la internet. Presenta un tamaño aproximado de 20.5 Mb (Meksem y cols., 2005); el cual es pequeño comparado con el genoma de otros hongos patógenos de plantas (Broad Institute's Fungal Genome Initiative). La base de datos Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) de *U. maydis* enlista actualmente 6,902 genes probables, mientras que en los ascomicetos fitopatogenos, el número de genes es considerablemente alto: 12,841 en *Magnaporthe grisea*, 16,597 en *Stagonospora nodorum* y 11,640 en *Fusarium graminearum* (Broad Institute's Fungal Genome Initiative). La presencia de un menor

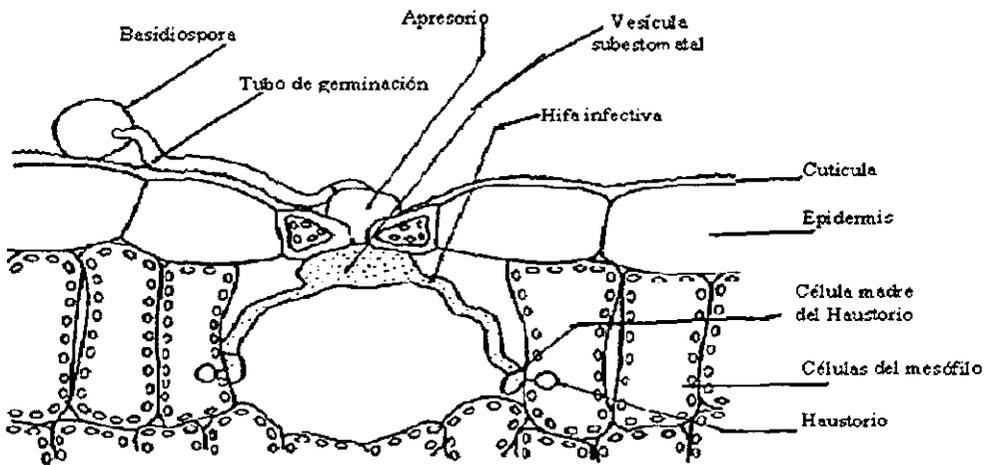


Figura1. Diagrama de las estructuras infectivas de un hongo biotrófico. Corte vertical de una hoja infectada. Adaptado de Ramesh Maheshwari (2000) "Fungi, experimental methods in biology".



Figura 2. Diferentes aspectos de *Ustilago maydis*. (a) Formación del tumores en la mazorca de maíz causado por la infección de *U. maydis*. (b) Fotografía del daño causado por *U. maydis* en la hoja de maíz. La imagen muestra una zona necrótica rodeada de clorosis, síntomas característicos de la infección. (c) Micrografía de esporidias haploides, microscopía electronica (SEM). (d) Micrografía del apresorio, la flecha marca el punto de entrada. (e) Micrografía de una esporidia acoplada a la epidermis de la hoja de maíz, la flecha señala el filamento dicariótico. Imagen (a) tomada de Martínez Pelayo-M. Usos alimenticios del Huilacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) Corda), Curso de Etnobotánica; (b) tomada de Laguna, I.G. y cols., 2009. Enfermedades de Zea mays L. (maíz). En: atlas fitopatológico argentino. 2(2):1851-8974; c, d, e) tomadas de Kämper y cols. (2006). "Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*" Nature 444, 97-101.

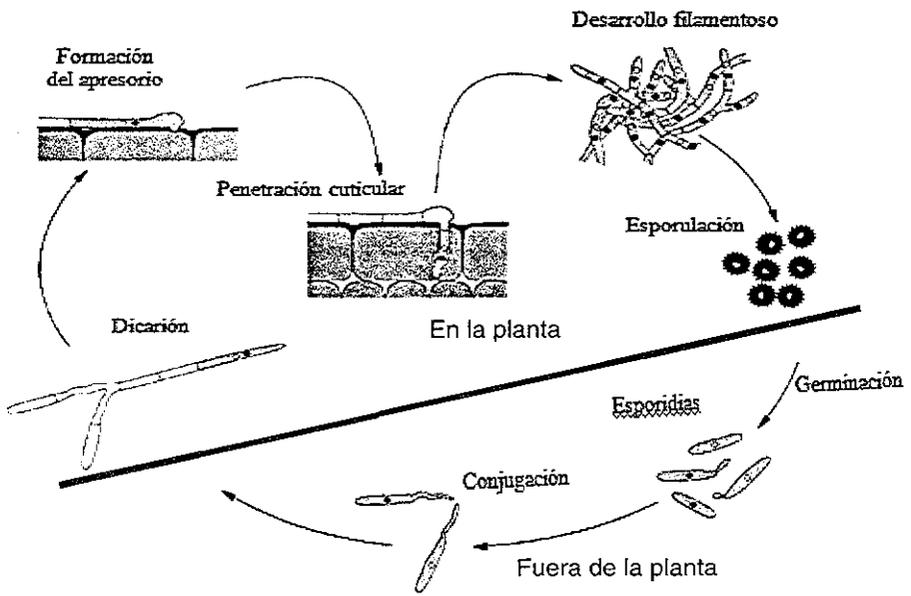


Figura 3. Fases del ciclo celular de *Ustilago maydis*. Adaptado de Kämper y cols. (2006). "Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*" Nature 444, 97-101.



Figura 4. Aspectos morfológicos de *Arabidopsis thaliana*. (a) planta adulta; (b) Tallo, silicua y racimo de flores; (c) racimo de flores; (d) acercamiento de una flor; (e) acercamiento de semillas, la barra blanca representa 1 mm; (f) dibujo del aspecto frontal y corte axial de una silicua mostrando las semillas; (g) portada de la revista *Nature* dónde se dio a conocer la secuenciación del genoma de *A. thaliana* en el año 2000; (h) hojas basales; (i) hojas en forma de roseta; (j) acercamiento de las hojas basales mostrando la forma elíptica y el margen dentado.

número de genes en *U. maydis* describe menos isoproteínas, por lo tanto es factible el seguimiento de genes únicos, siendo ésto una característica importante en su especificidad de hospedero.

## **2.2. Generalidades de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh**

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh., es una planta vascular angiosperma que pertenece a la clase de las Dicotiledóneas y a la familia de las Brassicáceas o Crucíferas (Strasburger, 1994). La familia abarca aproximadamente 340 géneros y más de 3,350 especies (Al-Shehbaz, 1984), así como diferentes ecotipos. La planta adulta de *A. thaliana* puede llegar a medir de 20 a 30 cm, el tallo es erecto con ramificación un poco alejada de la base y cubierto de tricomas (pelos) cortos ramificados, que se encuentran distribuidos desde la base de la planta, dispuestos muy densamente y que van desapareciendo o se reduce su densidad a medida que se aproxima a las inflorescencias. Las hojas van desde la forma elíptica a ovales con los bordes enteros. Tiene dos tipos de hojas, las basales de hasta 2 cm de largo por 0.5 cm de ancho, y arrosetadas (pegadas al suelo formando una roseta, de cuyo centro surge el tallo). Las flores se presentan en racimos no demasiado compactos, ubicados en el extremo de las ramas o el tallo, éstas se van separando unas de otras a medida que el tallo crece, una planta desarrolla aproximadamente 10 flores de tipo bisexual de unos 5mm de diámetro, su fruto es una silicua de unos 3 cm de longitud y 1 mm de anchura, cilíndrico, un poco arqueado, sin pelos y cada una contiene entre 30 y 60 diminutas semillas. En la madurez las semillas tienen un color anaranjado son lisas y miden medio milímetro aproximadamente (Figura 4). Como la planta continúa produciendo flores durante varios meses, es posible obtener hasta 10,000 semillas de un solo individuo (Meyerowitz, 1987; Serrano-Cartagena, 1998; Díaz, 2004).

### **2.2.1. *Arabidopsis thaliana*) como modelo de estudio**

Una de las principales características de *A. thaliana*, por la que se ha convertido en un importante modelo de estudio en la mayoría de los laboratorios, es que la planta presenta un tamaño pequeño, lo que permite sembrar hasta 10,000 plantas/m<sup>2</sup>, así como presentar un ciclo de vida corto (de aproximadamente seis semanas cuando es cultivada a 25 °C bajo iluminación continua). La planta es autógama permitiendo su autofecundación sin la intervención humana, reduciendo así gastos de mantenimiento y personal, las semillas de *A. thaliana* permanecen viables durante varios años a temperatura ambiente (Serrano-Cartagena, 1998). El tamaño reducido de su genoma lo hace un modelo ideal para el mapeo genético, facilitando su completa secuenciación (The *Arabidopsis thaliana* Genome Project). A principios del siglo XXI *A. thaliana* se convirtió en el primer genoma de una planta en ser completamente secuenciado (Adam, 2000), y el tercer organismo multicelular después de *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) y *Drosophila melanogaster* (Adam y cols., 1991).

El genoma haploide de *A. thaliana* contiene 157 Mpb (Bennett y cols., 2003) divididas en cinco cromosomas (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), y es considerablemente menor que el de otras plantas como el arroz 466 Mpb (Goff y cols., 2002; Yu y cols., 2002), maíz 2.500 Mb (Bennetzen, 2002), cebada 4.900 Mpb (Bennetzen, 2002) o trigo 16.000 Mpb (Adam, 2000). A pesar de las dimensiones de su genoma *A. thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en lo referente a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. En consecuencia, no hay razón alguna para pensar que tiene menos genes que cualquier otra planta con flores de las 250,000 especies existentes (Serrano-Cartagena, 1998).

### **2.3. Patosistema *Ustilago maydis*-*Arabidopsis thaliana***

Se ha mencionado con anterioridad la necesidad que tiene *U. maydis* de pasar por un hospedero para cumplir su ciclo de vida, este proceso es bastante complejo, por lo que se han buscado alternativas que faciliten su estudio, una de ellas es el uso

de un modelo experimental que permita caracterizar genes implicados en el proceso de patogenicidad con mayor facilidad que en el huésped natural (Méndez-Morán, 2004; Méndez-Morán y cols., 2005). En *U. maydis* se han realizado estudios con huéspedes no naturales tales como: sorgo, cebada, trigo, ajo, tabaco y papaya (León-Ramírez y cols., 2004) y más recientemente en *A. thaliana*, el cual establece la ocurrencia de la patogénesis en ausencia del ciclo sexual (que permite estudiar factores de virulencia de manera independiente) y la posibilidad de infección de células haploides (que permite el estudio de mutantes recesivas afectadas en patogenicidad) (Méndez-Morán y cols., 2005). El uso de este patosistema abre la posibilidad de ampliar el estudio de la interacción planta-hongo con base a que en ambos sistemas se encuentra su genoma completamente secuenciado y disponible, comparado con el huésped natural en donde además de que se requiere del ciclo sexual para el desarrollo de la infección no se encuentra secuenciado, lo que limita su caracterización, a diferencia de lo que ocurre con *A. thaliana* en donde el haploide puede infectar a diferencia del huésped natural y producir tumores característicos de la infección por *U. maydis*.

#### **2.4. Genes involucrados en patogénesis de *Ustilago maydis***

Las transiciones morfogénicas que presenta *U. maydis* están regulados por dos *loci* de apareamiento denominados *a* y *b* (Banuett y Herskowitz, 1994; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998). El locus *a* posee dos alelos diferentes (*a1* y *a2*) que intervienen en el reconocimiento de células opuestas para llevar a cabo la conjugación mediante el efecto de feromonas, el alelo *a* también mantiene el desarrollo filamentoso durante los primeros momentos del establecimiento de la infección en la planta (Klaus y cols., 2000), mientras que el locus *b* (multialélico) controla el crecimiento filamentoso y la patogenicidad de manera independiente (Banuett, 1995). La función del gen *b* está determinada por la interacción del heterodímero bE y bW que pertenecen a diferentes alelos (Gillissen y cols., 1992). El factor de transcripción Prf1 es activado por la interacción del heterodímero bE/bW (Yee y Kronstad, 1998), de lo contrario no se mantiene el desarrollo filamentoso y patogénesis (Klaus y cols., 2000).

El entrecruzamiento de las vías de señalización de las Proteínas de Activación por Mitógeno Cinasas (MAPK) y el Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc) está regulado por la proteína Ras2 que se une a GTP, se ha reportado que la activación de Ras2 (Ras2 esta activado por el gen *Sqf2*) que promueve el desarrollo de pseudohifas, en la cual se involucran la activación de MAPKK (*Fuzz 7*) y MAPK (*Ubc3*) (Lee y Kronstad, 2002). Genes como *Ubc4*, *Ubc3* y *Fuzz7* son independientes de la vía regulada por AMPc y están involucrados en la transducción de señales de dos formas: una dependiente del gen activado por la feromona y otra estimulada por señales específicas del huésped (Bannuett y Herskowitz, 1994). El gen *Prf1* regulado por la vía de las MAP kinasas y dependiente de AMPc codifica para un factor de transcripción de tipo HMG, el cuál determina la expresión de elementos involucrados en la respuesta a feromona (Hartmann y cols., 1996).

El gen *Ubc1* pertenece a la vía regulada por la Proteína Cinasa A (PKA) dependiente de AMPc y codifica para una subunidad regulatoria de la PKA. Las mutantes *ubc1* originan clorosis en plantas de maíz; sin embargo no son capaces de inducir tumores, de tal forma, que se puede inferir que los eventos posteriores a la conjugación son importantes para el desarrollo de la patogenicidad (Gold y cols., 1997; Durrenberger y cols., 1998). *Ukc1* codifica para una proteína relacionada a una Cinasa, y cuya disrupción resulta en una morfología afectada, altamente pigmentada e incapaz de producir micelio, por otro lado es avirulenta en plantas de maíz. Esto sugiere su participación en la morfogénesis, pigmentación y patogénesis (Durrenberger y Kronstad, 1999). Una disrupción del gen *Hgl1* mostró que su producto génico podría ser una diana de fosforilacion por una PKA con relación al apareamiento de células compatibles sexualmente y la señalización vía AMPc con dos aspectos importantes de la virulencia de *U. maydis*: la transición dimórfica y a la formación de teliosporas (Dürrenberger F. y cols., 2001). El gen *Kpp6* codifica para una MAPK que tiene un dominio N terminal no relacionado a proteínas de este tipo, cuyas mutantes son incapaces de penetrar la cutícula de la planta, lo que sugiere la respuesta de *Kpp6* a una señal de la planta para regular los genes necesarios y lograr de alguna manera la penetración y subsecuente infección (Brachmann y cols., 2003).

Los genes *Kin1* y *Kin2* cuyos productos génicos codifican para proteínas de tipo kinesinas, actúan sobre el citoesqueleto y están implicadas en el crecimiento de las hifas (Lehmler y cols., 1997). Otros genes encontrados son *Fuz1*, *Fuz2* y *Rtf1*. Los cuáles intervienen en la formación de teliosporas, distribución y tamaño de los tumores, germinación de esporas y formación de tumores, respectivamente (Banuett, 1991). El gen *Myo5* que codifica para una proteína miosina de la clase V, esta involucrada en la morfogénesis, dimorfismo y patogénesis de *U. maydis* (Weber y cols., 2003). El gen *UmChs6* es una quitina sintasa cuya disrupción resulta en una atenuación del desarrollo filamentoso y la inducción de tumores en maíz (Garcera-Teruel A. y cols., 2004). El gen *Yap1* esta relacionado la destoxificación del  $H_2O_2$  mecanismo que le permite hacer frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) emitidas por su huésped como defensa. Mutantes de *U.maydis* en el gen *Yap1* ( $\Delta yap1$ ) presentaron una hipersensibilidad al  $H_2O_2$  y una virulencia atenuada significativamente por lo que se puede inferir que *Yap1* es utilizado por *U. maydis* durante el proceso infectivo en su huésped (Molina L. y Kahmann R., 2007). El gen *Pep1* codifica para una proteína secretada por *U. maydis* cuya expresión es esencial para la penetración de las hifas en su hospedero. En mutantes ( $\Delta pep1$ ) de la cepa solopatogénica SG200 se observaron defectos en la formación del micelio y los apresorios, pero no causó alteraciones en morfología, desarrollo o tolerancia al estrés, por lo que *Pep1* se relaciona directamente con la posibilidad de penetración de *U. maydis* en las células de su huésped (Doehlemann G. y cols., 2009). El gen *Rok1* es una fosfatasa que controla la fosforilación de Kpp2 y Kpp6 en la señalización de las MAPK; mutantes ( $\Delta rok1$ ) sobreexpresoras resultaron en un incremento considerable de la virulencia, esta diferencia se debió a una mejor eficiencia en la formación de apresorios y la invasión del huésped (Di Stasio M. y cols., 2009)(Figura 5).

Los genes antes descritos son solo algunos de los que se ha demostrado su intervención en el proceso patogénico de *U. maydis*; sin embargo aún falta por conocer como responde *U. maydis* a las señales de su huésped y como influyen en su paso dentro del mismo.

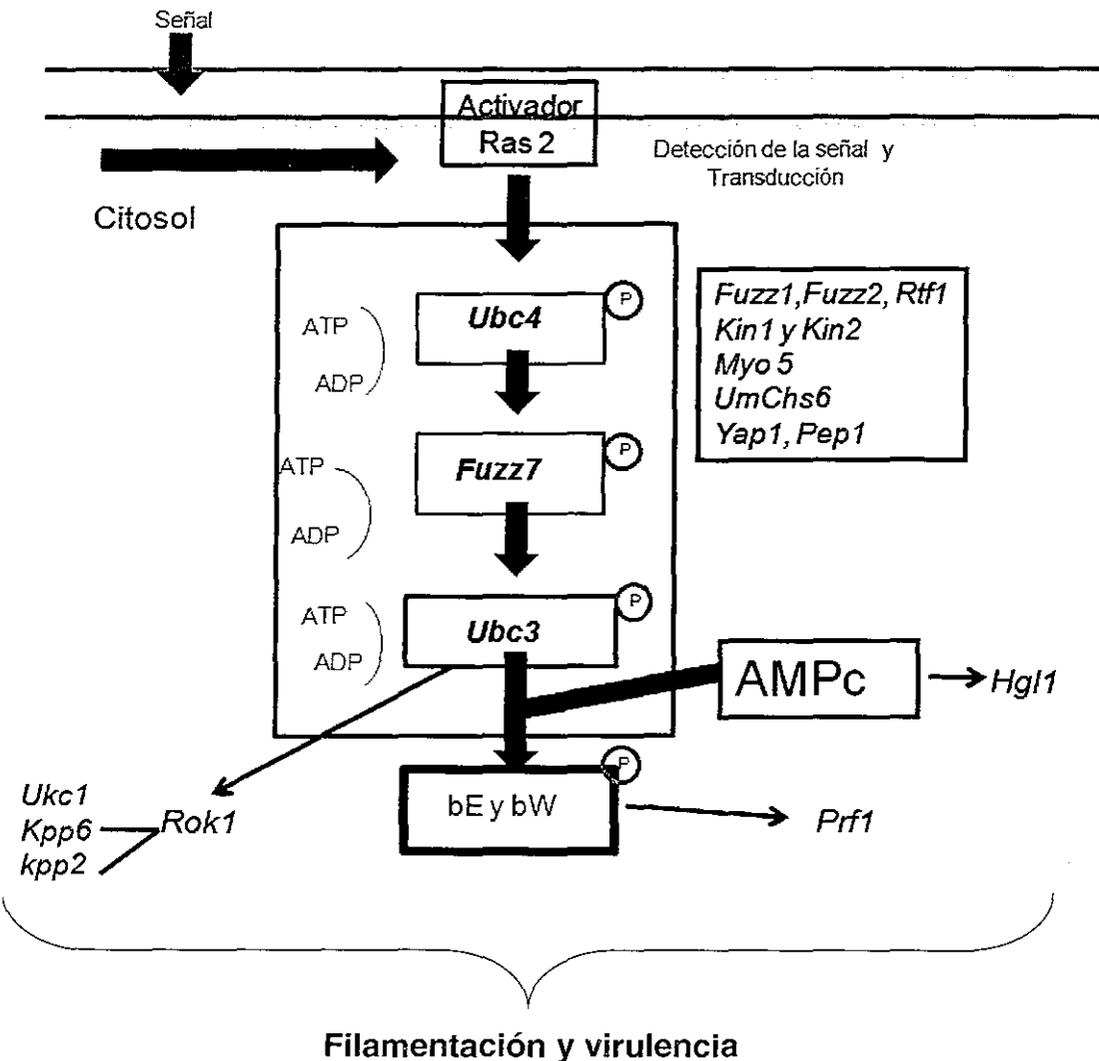


Figura 5. Representación esquemática de la regulación y expresión de genes responsables de la transición dimórfica y virulencia de *Ustilago maydis* reportados hasta la fecha (Gillissen y cols., 1992; Banuett y Herskowitz, 1994; Banuett, 1995 Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Bolker, 2001; Lee y Kronstad, 2002; Garcerá-Teruel A. y cols., 2004; Molina L. y Kahmann R., 2007; Doehlemann G. y cols., 2009; Di Stasio M. y cols., 2009).

## **2.5. Sistemas diseñados para el análisis de expresión diferencial**

La capacidad de secuenciar genomas completos desarrollados en la última década ha impulsado a la investigación científica en la dirección de definir la función de cada uno de los genes identificados. Para contribuir con ese objetivo se han diseñado metodologías que permiten estudiar la expresión génica global en un determinado tejido y en un momento particular del desarrollo, posibilitando la identificación inicial y el agrupamiento en clases funcionales de secuencias nuevas con una actividad asociada. Los procedimientos para esta evaluación han progresado desde los métodos desarrollados para el análisis de genes únicos y específicos (como el northern blot y dot blotting, la RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa y los ensayos de protección de nucleasas) hacia otros, enfocados en la identificación de múltiples transcritos que difieren en su representación entre las diversas muestras experimentales (como la hibridación substractiva [Figura 6 y 7], el despliegue diferencial, el ADNc-AFLP®, la secuenciación de etiquetas expresadas o EST, el análisis serial de la expresión de genes o SAGE y la hibridación de microarreglos). La organización de las secuencias dentro de grupos funcionales basada en los datos de expresión y de homología proporciona un marco básico para conducir nuevos estudios dirigidos a definir la actividad precisa de cada producto génico (Pessino y cols., 2004).

### **2.5.1. Hibridación substractiva**

Los métodos de hibridación substractiva fueron creados a principios de la década de los '80s, con el propósito de construir bibliotecas de ADNc para obtener sondas de genes expresados diferencialmente (Pessino y cols., 2004). La hibridación substractiva permite comparar dos poblaciones de ARNm y obtener clonas de genes que se expresan en una de las poblaciones, pero no en la otra. La teoría básica de la substracción es simple, primero ambas poblaciones (Control y problema) de ARNm son transformadas a ADNc de doble cadena a continuación son digeridas con la enzima de restricción RSA I, el ADNc problema se subdivide en 2 poblaciones, cada una es ligada con un adaptador diferente (Figura 6). Los adaptadores no contienen

grupos fosfato, así que solo un extremo de cada adaptador se une a los extremos 5' del ADNc. Los dos adaptadores tienen secuencias idénticas en los extremos que les permiten el alineamiento con el oligonucleótido del PCR una vez que los extremos vacíos de las cadenas son rellenados.

El problema y el control son hibridados en dos ocasiones, en la primera, un exceso de ADNc control digerido es agregado a cada muestra problema previamente separadas, entonces las muestras son desnaturizadas por calor y posteriormente alineadas, generando diferentes tipos de moléculas (Figura 8a, b, c, y d). Durante la segunda hibridación, las primeras muestras hibridadas son mezcladas sin desnaturizar; ahora solo los ADNc's de cadena sencilla del problema restantes abstraídos, se pueden reasociar y formar los nuevos tipos de híbridos; estos nuevos híbridos son moléculas de doble cadena con extremos diferentes, los cuales corresponden al adaptador 1 y 2R (Figura 8e). El nuevo ADNc desnaturizado del control, es agregado para enriquecer aún más las moléculas de distinto adaptador con secuencias diferencialmente expresadas. Después de rellenar los extremos de las cadenas con la ayuda de ADN polimerasa, las secuencias complementarias con diferente adaptador tienen diferentes sitios de alineamiento para los iniciadores anidados en sus terminaciones 5' y 3'. Toda la población de moléculas se somete a PCR para amplificar las secuencias diferencialmente expresadas que se desean obtener. Debido al efecto de supresión del PCR, la mayoría de las secuencias complementarias que tienen un mismo adaptador forman una estructura con forma de anillo que evita su amplificación exponencial (Figura 7). Las secuencias complementarias con un sólo adaptador tienen una amplificación lineal y sólo las complementarias con diferente adaptador se amplifican exponencialmente (Figura 8e).

El procedimiento completo requiere únicamente de 0.5-2.0 µg de poli A+ARN y no requiere separación física de las cadenas dobles y simples, además la supresión debida a los sucesivos PCR's previene la amplificación de moléculas indeseables mientras que se enriquecen las moléculas objetivo (Diatchenko y cols., 1996; Galbraith y cols., 2004). En la figura 7, se muestra un diagrama de la metodología

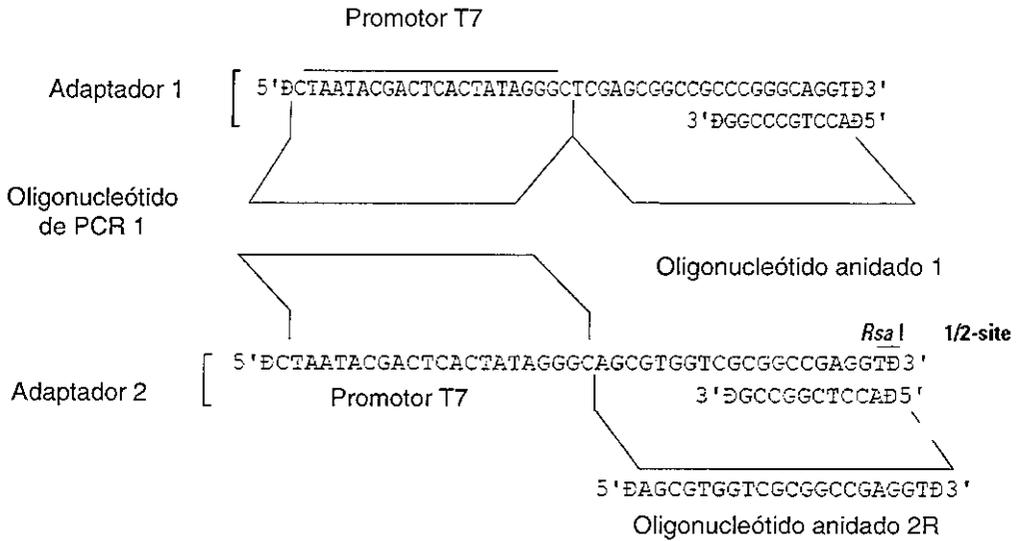


Figura 6. Secuencia de los Adaptadores 1 y 2R, que muestra el promotor T7 además de los oligonucleótidos 1 y 2R utilizados en la Hibridación Substractiva. Adaptado del manual "PCR-Select cDNA Subtraction Kit" de CLONTECH®, 2007.

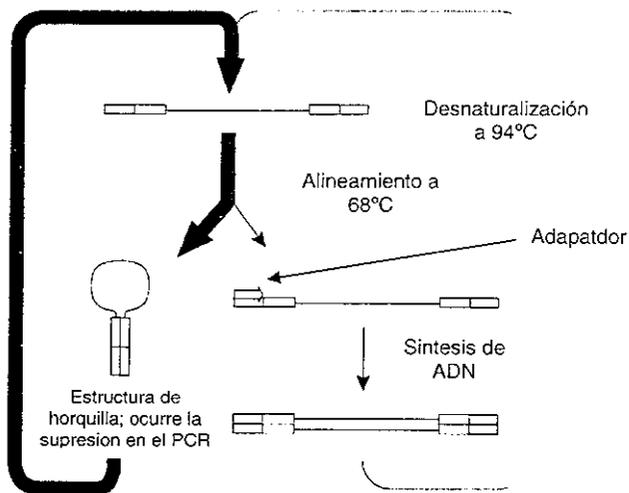


Figura 7. Esquema del proceso de substracción por PCR en la metodología de Hibridación Substractiva. Las estructuras en forma de horquilla impiden la amplificación de secuencias indeseables. Adaptado del manual "PCR-Select cDNA Subtraction Kit" de CLONTECH®, 2007.

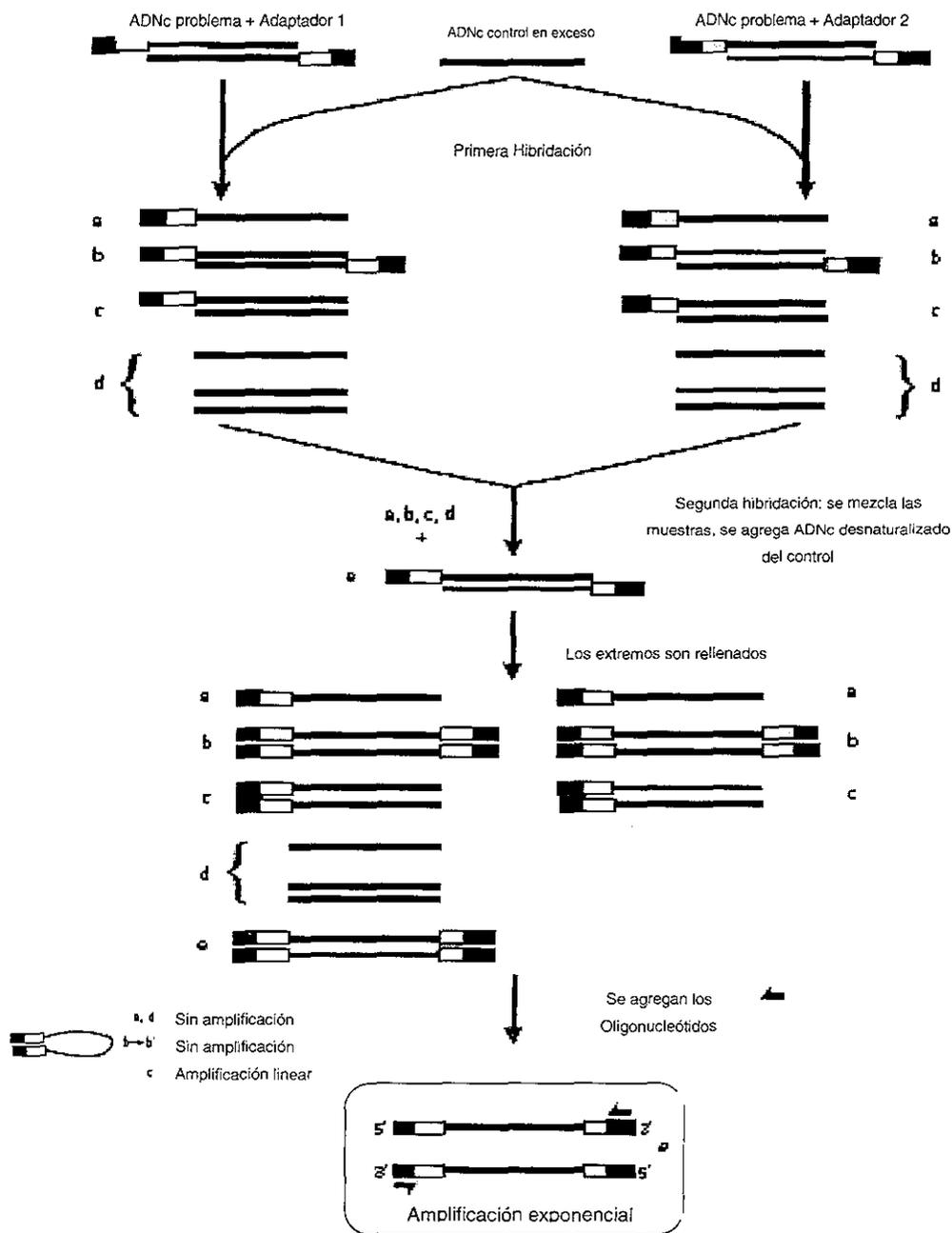


Figura 8. Esquema que muestra la secuencia de pasos a seguir por la técnica de Hibridación subtractiva. Dentro del rectángulo azul se muestran las secuencias deseadas que presentaran una amplificación durante el PCR. Adaptado del manual "PCR-Select cDNA Subtraction Kit" de CLONTECH®, 2007.

seguida por la Hibridación Substractiva para posteriormente construir las bibliotecas de ADNc.

## **2.6. Bioinformática**

### **2.6.1. Herramientas Bioinformáticas**

Recientemente las técnicas basadas en la tecnología del ADN recombinante han logrado avances poco convencionales. Técnicas como la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR por sus siglas en inglés) han permitido obtener grandes cantidades de ADN a las que se podría obtener por métodos convencionales, aumentando la posibilidad de la experimentación (Rey y Piedra, 2002). La técnica es específica, sensible y rápida, sin embargo, su funcionalidad estaría incompleta sin el arribo de las tecnologías informáticas y la internet, transformando la estructura de almacenamiento y acceso a los datos, lo que ha permitido el desarrollo de aspectos fundamentales para el avance de los conocimientos sobre los sistemas biológicos (Baxevanis y Ouellette, 2001).

La bioinformática nace entonces del uso de las herramientas computacionales aplicadas a la búsqueda de soluciones de problemas biológicos (Zdobnov y cols., 2002). Tanto el análisis genómico como sus disciplinas relacionadas pueden ser abordados desde una perspectiva diferente, a partir de la enorme disponibilidad de proteínas y secuencias moleculares acumuladas en bases de datos internacionales como: GenBank (que pertenece al NCBI), Laboratorio de biología molecular Europeo (EMBL), Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ) y la base de proteínas mundial (UniProt). El impacto de los proyectos en genómica durante los últimos 10 años, ha sido impulsado por un lado, debido a la creciente disponibilidad de secuencias, y por el otro la gran diversidad de datos biológicos acumulados, cuyo principal fin ha sido la búsqueda de similitud entre las secuencias moleculares, el análisis comparativo (filogenético y taxonómico) de especies, el análisis de macromoléculas, la ingeniería y diseño de estructuras proteicas, entre otros (Kanehisa y Bork, 2003).

Dentro de las herramientas bioinformáticas que se han desarrollado para facilitar la interpretación de datos biológicos se encuentran: a) bases de artículos

científicos; b) bases de información molecular; c) bases de genomas secuenciados; d) bases de dominios; e) alineamientos de un par o múltiples secuencias; f) búsqueda de homólogos remotos; g) predicción de genes; h) paquetes de diseño de oligonucleótidos; l) programas de predicción proteica, entre otros (Paniego y cols., 2004).

### **2.6.1.1. Alineamiento entre pares de secuencias**

Una de las maneras más frecuentes de obtener información sobre una o un grupo de secuencias incógnitas, es mediante la búsqueda comparativa utilizando la información depositada en distintas bases de datos (Paniego y cols., 2004). Uno de los métodos comparativos más comunes es el alineamiento de pares de secuencias, entre las plataformas más usados se encuentran: Basic Local Aligneamient Search Tool (BLAST) (Altschul y cols., 1990), FASTA (Pearson, 1988) y Smith-Waterman search (SSEARCH) (Dayhoff, 1978) que miden similitud o identidad entre secuencias pero no homología.

Para la interpretación de los resultados obtenidos en la búsqueda de similitud entre bases nucleotídicas, se utiliza cualquiera de los algoritmos FASTA, BLAST o SSEARCH, en donde el valor más representativo que se considera es el error o valor E (Altschul, 1998). Éste depende del valor positivo de comparación a lo largo de la secuencia incógnita y del tamaño de la base de datos analizada; mide las posibilidades de que el alineamiento obtenido no sea solamente causa del azar. Así un valor E de 0.001 (que es el valor de corte más usado para las búsquedas con BLAST) significa que hasta 1 de cada 1000 alineamientos puede haberse dado al azar. Un valor cercano o menor a  $1 \times 10^{-50}$  es menos frecuente de encontrar, y resulta muy confiable en cuanto a que las secuencias alineadas estén evolutivamente relacionadas, no obstante esta apreciación exige una confirmación mediada por un análisis filogenético (Altschul y cols., 1990).

### 2.6.1.2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

El algoritmo BLAST es un programa informático que permite realizar alineamientos locales y globales así como regiones de similitud entre genes no relacionados, de tal forma que en un tiempo relativamente corto se pueden encontrar secuencias de genes con una similitud al fragmento de la secuencia analizada y de esta manera inferir en su función, parentesco, efecto de sondas, diseño de oligonucleótidos específicos, entre otros (Nei y Kumar, 2000). BLAST permite además hacer comparación de secuencias de nucleótido a nucleótido (BLAST'n), de aminoácidos a aminoácidos (BLAST'p), la traducción de una secuencia de bases nitrogenadas a aminoácidos (BLAST'x) y viceversa, los cuáles arrojan un porcentaje de similitud y dan información sobre la proteína codificante con respecto a la secuencia similar en el banco de datos (Altschul y cols., 1997).

### 2.6.2. Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos (primers, cebadores o iniciadores) es un paso crítico en la aplicación de la "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) (Yang y cols., 2006), por lo que poner un especial cuidado en el diseño es de gran importancia. Para diseñar correctamente un par de oligonucleótidos es necesario comprender sus propiedades y los factores que lo afectan (Dieffenbach y cols., 1995). Entre los factores estructurales que influyen en su eficiencia encontramos: a) tamaño del oligonucleótido que influye en la especificidad, la temperatura de fusión y el tiempo necesario para la hibridación a la secuencia complementaria, la longitud óptima debe ser entre 18-24 bases; b) temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) debe ser de 55-60°C, además es importante que ambos oligonucleótidos tengan temperaturas de fusión similares ( $2 \pm ^\circ\text{C}$ ); c) la especificidad, depende de la longitud del oligonucleótido, y de la temperatura de fusión (55-72°C), por lo que se debe evitar escoger secuencias altamente repetitivas que puedan hibridar en varios sitios en nuestro molde de ADN; d) la complementariedad en la secuencia de los oligonucleótidos, se deben evitar, para eliminar la posibilidad de formar dímeros entre

los oligonucleótidos que impiden la formación del producto por competición; e) el contenido en G/C, debe estar entre 45% y 55%, evitando zonas ricas en poli A o poli T; f) se debe considerar un residuo de G o C en el extremo 3' del oligonucleótido para asegurar que el extremo 3' hibride correctamente y con ello minimizar el desacoplamiento del oligonucleótido; g) en el extremo 5'-terminal y regiones centrales, es conveniente incluir regiones ricas en GC con el fin de incrementar la estabilidad del oligonucleótido a su secuencia diana (Sharrocks y cols., 1994; Innis y cols., 1994; Dieffenbach y cols., 1995; Pinzón, 2007; Yuryev, 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Para reducir la pérdida de producción alimenticia a consecuencia de microorganismos patógenos se han desarrollado una gran cantidad de productos sintéticos (pesticidas), que resolvieron aparentemente este problema, sin embargo, los avances científicos demostraron la magnitud de los estragos que estos productos causaban al ecosistema y a la salud, por ejemplo Wilson y Wisniewsky (1989) demostraron que se presentó un riesgo elevado a la salud (60% de contraer cáncer) cuando se utilizaron estos productos.

Estos antecedentes ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos mecanismos que contrarresten el daño causado por hongos, evitando cualquier riesgo; una alternativa viable es la síntesis de nuevos productos naturales de actividad biológica, lamentablemente aún es mucho el trabajo que debe de hacerse en ciencia básica para dilucidar los principios moleculares de la interacción planta-patógeno que sean la base para el desarrollo de estos nuevos productos.

A través del estudio a nivel molecular del proceso de patogenicidad en hongos, se abre la posibilidad de diseñar estrategias efectivas que permitan el control de diversas enfermedades al tener una mayor comprensión de los procesos biológicos y de los productos genéticos participantes.

El presente trabajo radica en la generación de una base de datos de ADNc's diferenciales con el fin de generar conocimiento que ayude a entender el proceso patogénico de *U. maydis*, principalmente sobre aquellos genes que participan durante este proceso, complementando con esto los diversos estudios que se han enfocado principalmente hacia las vías de señalización y de transducción de señales involucradas en dicho proceso (Ruiz-Herrera, 1998). La comprensión de los diferentes niveles del proceso patogénico de *U. maydis* como modelo, puede ser la base para poder diseñar estrategias que permitan el control de hongos fitopatógenos biotróficos.

*U. maydis* es un sistema modelo importante para develar los mecanismos moleculares de patogenicidad de hongos (Basse y Steinberg, 2004). Por lo que al encontrar genes que se expresan de manera diferencial durante el proceso

patogénico, se bordea la posibilidad de encontrar uno o algunos genes necesarios para regular dicho proceso, de esta manera comprender el proceso patogénico de otros hongos al extrapolar los resultados obtenidos en este estudio.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Obtener un banco de ADNc diferencial durante la infección temprana de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* mediante hibridación substractiva.

### **4.2. Objetivos específicos**

- 1) Obtener un banco de ADNc diferencial mediante el método de hibridación substractiva a las 72 h posteriores a la infección (hpi) por *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana*.
- 2) Realizar el análisis bioinformático de los fragmentos obtenidos y seleccionar al menos uno para determinar su posible función.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico y condiciones de cultivo

#### 5.1.1. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh

Se utilizó la variedad silvestre de *Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta (Ler.) como huésped para *Ustilago maydis*, el medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1969) con algunas modificaciones: Solución (1)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 20.6 mM;  $\text{KNO}_3$ , 18.8 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 mM; KI, 5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 25  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mM;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30 mM;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 mg/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L. Solución (2)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.15 mM. Solución (3). Inositol, 100 mg/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mM;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mM; glicina, 2 mg/L; piridoxina.HCl, 0.5 mg/L; ácido nicotínico, 0.5 mg/L; tiamina.HCl, 0.1 mg/L. Se mezclaron las tres soluciones, en una proporción 1:1:1 (v/v), se llevó a pH a 5.7-6.0 con Hidróxido de Potasio (KOH) 1M, 1% de agar, se esterilizó el medio en autoclave y se vació en cajas de petri altas (25 X 100 mm).

Para el cultivo de *A. thaliana* las semillas fueron desinfectadas con alcohol etílico al 70% estéril durante cinco minutos, transferidas a una solución de hipoclorito de sodio (30%) por 10 minutos, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas (25) y se incubaron en condiciones controladas de temperatura (25°C), con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

#### 5.1.2. *Ustilago maydis* (DC) Corda.

Se utilizó la cepa silvestre FB1 (a1b1) (Flora Banuett, California State University, Long Beach). La cepa se cultivó en Medio completo (MC) (Hollyday, 1974). El cual se detalla a continuación: glucosa 1%, hidrolizado de caseína, 0.25% extracto de levadura, 0.1%;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.15% y 62.5 mL de solución de sales por litro (la solución de sales contiene:  $\text{KH}_2\text{P}_4$  16g/L,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  4g/L,  $\text{MgSO}_4$  2g/L,  $\text{CaCl}_2$  1g/L, KCl 8g/L; elementos traza 8 mL/L los cuales contienen:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.06 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.14g/L, ZnCl<sub>2</sub> 0.4g/L, NaMoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.04g/L, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.1g/L, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.4g/L). Se agregó carbencilina (50 µL/mL).

Las condiciones de cultivo fueron las descritas por Sambrook y cols. (1989). Se tomaron alícuotas de la cepa mantenida a -70°C en glicerol estéril al 50% (v/v), se crecieron en 3 mL de MC y se mantuvieron en agitación constante a 28°C de 2 a 3 días. Dichos cultivos se utilizaron como preinoculo. Alícuotas de los preinoculos (50 µL) fueron inoculadas en 3 mL de MC en tubos de ensayo y se mantuvieron en agitación constante a 28°C de 18-24 h. El cultivo se centrifugó (3,000 X g/5 min) y las células fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril y resuspendidas en agua destilada estéril.

### 5.1.3. *Escherichia coli*.

La cepa de *Escherichia coli* utilizada fue la TOP10 F' de Invitrogen, su genotipo es: F' {lacI<sup>q</sup>, Tn10(Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 *recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galJ galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*, es quimiocompetente y necesita IPTG para inducir el color azul/blanco para la selección de recombinantes; además presenta una tasa de transformación de 1x10<sup>9</sup> ufc/µg pUC DNA.

El medio de cultivo utilizado fue: Luria-Bertoni (LB), que contiene: extracto de levadura, 1.0%; Bacto triptona, 1.6%; NaCl, 1%; se llevó a pH 7.0 con NaOH 5 N (Sambrook y cols., 1989). Las condiciones de cultivo se describen a continuación: las células se incubaron a 37°C toda la noche por un tiempo no mayor a 20 h en agitación constante a 350 rpm. En los casos necesarios se añadió agar al 2%, y para la selección de clonas resistentes se adicionó carbencilina (50 µg/mL), bromocloroindol β-D-galactósido (X-gal) en dimetilformamida (20 µg/mL) e IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosida) en agua destilada (concentración final de 1 µM).

## 5.2. Inoculación de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con *Ustilago maydis*

*U. maydis* fue cultivado *in vitro* en MC a 28°C en agitación constante de 18-24 h. Las células se recuperaron por centrifugación (3,000 X g / 5 min) para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  esporidias/mL y se resuspendieron en agua destilada estéril, el conteo de esporidias se llevó a cabo con un hemocitómetro en un microscopio compuesto. De esta suspensión, 0.5  $\mu$ L ( $5 \times 10^4$  esporidias/mL) fueron inoculados en la epidermis de las hojas (entre las dos primeras hojas verdaderas) de plántulas de seis días posteriores a la germinación (dpg), después las plantas fueron incubadas en una cámara de crecimiento en condiciones controladas a 25°C con un fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad hasta cumplir 72 hpi. Los controles correspondieron a plántulas de *A. thaliana* de ocho días de crecimiento sin inocular y el cultivo haploide de *U. maydis* crecido *in vitro* en MC.

## 5.3. Manipulación de ácidos nucleicos

### 5.3.1. Aislamiento de ARN total

Se partió de ARN total aislado con el protocolo de extracción de ARN con TRIZOL (Invitrogen) y el kit "Micro to Midi RNA purificación system" (Invitrogen) con algunas modificaciones. Para el control se utilizó ARN de plantas de *A. thaliana* no inoculadas y ARN de *U. maydis* cultivado *in vitro* (2  $\mu$ g de cada muestra de ARN) y el problema consistió en ARN de plantas de *A. thaliana* infectadas con *U. maydis* (4  $\mu$ g).

Para determinar la pureza y concentración del ARN obtenido de cada muestra se utilizó electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes (Sambrook y col., 1989) comparado con un marcador de peso molecular de concentración conocida (1  $\mu$ g/ $\mu$ L). La integridad y calidad del ARN obtenido se determinó por comparación del ARN correspondientes a las fracciones ribosomales 28S y 16S en geles de agarosa.

### 5.3.2. Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Para llevar a cabo el RT-PCR, se utilizaron los reactivos y metodología descrita en el manual de la técnica "PCR-select cDNA subtraction kit" (CLONTECH®) y el "kit transcriptasa reversa Super Script II" (Invitrogen). En tubos separados, se mezclaron los ARN con el oligonucleotido de síntesis de ADNc 10 mM (5'-TTTTGTACAAGCTT-3'), ajustando a un volumen final de 5 µL con H<sub>2</sub>O estéril libre de ARNasas y se incubó cada reacción a 70 °C por 2 min para obtener la primera cadena después se colocaron en hielo por un tiempo de 2 minutos. Posteriormente se adicionó buffer de síntesis de la primera cadena 5X (contiene 250 mM Tris-HCl pH 8.5, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl y 5 mM ditiotretitol), dNTPs 10 µM, 1 µL de de transcriptasa reversa (50U/µL) y H<sub>2</sub>O estéril para un volumen de reacción de 10 µL; se mezcló e incubó durante 1.5 h a 42 °C. Inmediatamente se procedió a la síntesis de la segunda cadena, se agregó 1X de buffer de síntesis de la segunda cadena 5X (contiene 500 mM KCl, 50 mM Sulfato de amonio, MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM b-NAD, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, y 0.25 mg/mL BSA) para una mezcla de reacción 1X, dNTPs (10 mM cada uno), 1X de la mezcla de enzimas para la segunda cadena 20X (contiene 6 U/µL de ADN polimerasa I, 0.25 U/µL de RNasa H y 1.2 U/µL de *E. coli* ADN ligasa), y H<sub>2</sub>O estéril hasta ajustar a un volumen de reacción de 80 µL, se incubó a 16 °C por 2 h, e inmediatamente se agregó 6U de T4 DNA polimerasa y se incubó 30 min a 16 °C. Se detuvo la reacción con 1X de EDTA/glicógeno 20X. Posteriormente se purificaron los productos de PCR utilizando la metodología descrita en el "PCR Clean-up Kit" (LAMDA BIOTECH®).

Como control de carga para *Ustilago maydis* se utilizó un par de oligonucleótidos reportados por Kuske y cols. (1998) que amplifican un fragmento de 735 pb aproximadamente correspondiente a la fracción de ARNr 18S. NS1 sentido (5'-GTAGTCATA TGCTTGCTC-3'; NS2 antisentido (5'-GGTGCTGGCACCAGACTTGG-3'), con una T<sub>m</sub> de alineamiento de 58°C. El programa de amplificación de PCR se describe a continuación: 94°C durante 2 min; 35 ciclos de 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min y finalmente una extensión a 72 °C 5 min.

Como control de carga para *A. thaliana* se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 402 pb de la fracción del ARNr 18S. At18S sentido (5'CCTCCGGCGCTGTTACTTTG-3'); At18S antisentido (5'-GTTTCAGCCTTGCGA CCATACTC-3'), con una Tm de alineamiento de 56.7 °C. El programa de amplificación de PCR se describe a continuación: 94 °C 30 s; 35 ciclos a 94 °C 30s, 56.7 °C 30 s, 72 °C 40 s y finalmente una extensión a 72 °C de 10 min.

### 5.3.3. Aislamiento de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

La obtención de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y cols. (1989), con el método de lisis alcalina de Birboim y Doly (1979) que se describe a continuación: 3 mL de medio de cultivo LB con antibiótico (carbencilina 50 µL/mL) con la cepa incubada por un período de 18 h a 37°C, se centrifugó a 3,000 X g durante 5 min a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se descarto y se dejó secar perfectamente el precipitado. Se adicionaron 200 µL de solución de lisis I (glucosa 50 mM, Tris HCl 20 mM) fría con enzima RNasa (2 U/µL). Se adicionaron 300 µL de la mezcla lítica o solución II, se mezcló por inversión, y se incubó a 37°C 5 min. Se adicionaron 200 µL de acetato de potasio 3M pH 5.2 (solución III) fría. Se incubó 10 min en hielo, y se mezcló por inversión, se centrifugó a 10,000 X g a 4°C durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio. Se utilizó un volumen igual de isopropanol frío y se mezcló por inversión, se incubó a -20°C 15 min, se centrifugó a 10,000 X g 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante. Se lavo la pastilla con etanol al 70 %, y se centrifugó a 10,000 X g 10 min, nuevamente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de 5 a 10 min. Finalmente se resuspendió la pastilla con 30 µL de agua estéril.

Para obtener ADN plasmídico de mayor pureza para secuenciación se usaron columnas de intercambio aniónico (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

### 5.3.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron aproximadamente 2 ng de ADNc o 2 ng de ADN plasmídico. La cantidad de los iniciadores fue de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  cada uno, la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados fue de 10 mM y 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ . El volumen de la reacción fue de 50  $\mu\text{L}$  y ésta se inició agregando 2 U/ $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y su regulador concentrado 10 X. Un programa típico de PCR es el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C, por 3 min, seguida de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a temperatura cercana a la  $T_m$  de los iniciadores por 30 s y polimerización a 72°C por un tiempo que cumple la siguiente regla: por cada 1000 pb se requiere de 1 min.

### 5.4. Obtención de la biblioteca mediante Hibridación Substractiva

Se realizó la construcción de bancos diferenciales utilizando la técnica “*PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit*” Clontech bajo las especificaciones del proveedor. Se utilizó ARN total extraído con anterioridad; se procedió a obtener el ADNc por medio de RT-PCR. El ADNc de la muestra problema (plántulas de 72 hpi), y el ADNc control (plántulas sin infectar, así como *U. maydis* crecido *in vitro*) producto del ARN total aislado, se amplificó por medio de RT-PCR para la obtención de ADNc de doble cadena. Con las muestras de ADNc obtenidas se procedió a obtener bancos de expresión. Las muestras problema se separaron en dos poblaciones. A una población se ligó el primer adaptador (Ad1) y a la otra población el segundo adaptador (Ad2R). El ADNc control no se le adicionan adaptadores. Las poblaciones Ad1 y Ad2R se hibridaron en forma separada con el ADNc control. Posteriormente los productos de esa hibridación se mezclaron y se realizaron dos amplificaciones por PCR, para obtener sólo la amplificación de aquel ADNc de doble cadena (híbridos) que presentaron diferentes adaptadores, los cuales se amplificaron exponencialmente.

## **5.5. Vector para *Escherichia coli***

El vector utilizado fué pDRIVE (Qiagen), cuya longitud es de 3,851 pb, posee un gen Lac Z  $\alpha$  (que permite seleccionar a los recombinantes de manera visual), y un par de genes de resistencia a ampicilina y kanamicina (para la selección de clonas resistentes) (Figura 9).

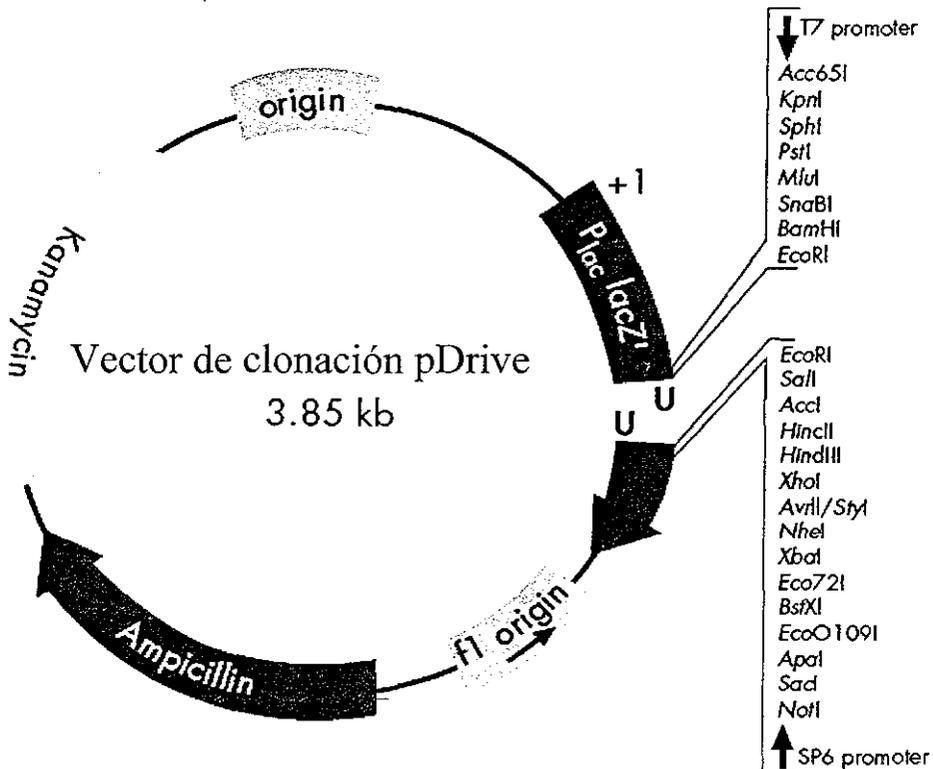
Éste plásmido se utilizó para la clonación de los productos de amplificación por PCR obtenidos durante la técnica de hibridación substractiva.

### **5.5.1. Transformación de células competentes de *E. coli***

Se adicionaron 2  $\mu$ L del ADN transformante a 100  $\mu$ L de células competentes TOP10 F' (Invitrogen), se dejó en hielo por 10 min, se aplicó un choque térmico de 2 min a 42 °C y se dejó en hielo 5 min más. Posteriormente se adicionaron 900  $\mu$ L de medio LB y se incubó por 1 h a 37 °C en agitación lenta.

### **5.5.2. Análisis de clonas transformantes e inserto**

Las clonas transformantes que crecieron en las placas con medio selectivo LB con carbencilina, IPTG y X-gal, sólo aquellas colonias con crecimiento de color blanco (clonas positivas) fueron seleccionadas, mientras que las colonias azules se eliminaron (indica la ausencia de inserto). Se verificó la presencia de insertos en las clonas positivas, con ayuda de un palillo estéril se pico la clona transformante y se colocó en 3 mL de medio de cultivo LB con antibiótico y se incubó con agitación durante 18 h a 37°C. Después se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina de Birboim y Doly (1979) como se menciono anteriormente y se verificó su presencia mediante electroforesis en gel de agarosa.



Elemento	Posición (pb)
Sitio de clonación múltiple	266-393
Péptido Lac Z $\alpha$	216-593
Gen de resistencia a Ampicilina	1175-2032
Gen de resistencia a Kanamicina	2181-2993
Origen de fago f1	588-1043

Figura 9. Esquema del mapa del vector de clonación pDrive (Qiagen) utilizado para la transformación de células de *E. coli*, en el cual se muestra el sitio de clonación múltiple y los genes de resistencia a kanamicina y ampicilina, el gen Lac Z  $\alpha$ , el sitio de origen f1 y se indican las enzimas de restricción que flanquean el sitio de clonación múltiple. Adaptado del manual QIAGEN PCR Cloning<sup>plus</sup> Kit 2001.

## **5.6. Almacenamiento de la biblioteca substractiva**

Las colonias transformantes positivas (o blancas) fueron inoculadas por separado en 3 mL de medio LB con antibiótico y fueron incubadas con agitación durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se procedió a colocar 300 µL de cada uno de los cultivos para almacenarlos en cajas de 96 muestras en glicerol al 50%, se resuspendieron y se almacenaron a -20°C.

## **5.7. Electroforesis en geles de agarosa**

Para el corrimiento electroforético de ADN se utilizaron geles de agarosa al 1.2 % en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) 1 X. Para la visualización de los fragmentos de ADN, se tiñe el gel de agarosa con una solución de BrEt a una concentración final de 0.5 µg/mL. La separación de los fragmentos de ADN se realizó aplicando un voltaje constante de 50 a 100 V, en una cámara de electroforesis que contiene el mismo regulador TAE 1 X. El tamaño de los fragmentos separados se determinó por comparación del corrimiento de bandas con marcadores de peso molecular de ADN comerciales (Boehringer Mannheim). Los geles se visualizaron con luz UV en un transiluminador marca "Ultraviolet Products" (UVP) de 365 nm UV, la imagen se digitalizó utilizando una cámara digital Power Shot S31S (CANNON).

La presencia y tamaño de fragmentos se observó por electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR, y utilizando un marcador de peso molecular de ADN (1 kb; Invitrogen). Se identificaron aquellos plásmidos que presentaban insertos, de los cuales se seleccionaron algunos para ser secuenciados.

## 5.8. Secuenciación

La secuenciación de los ADN plasmídicos se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad IRAPUATO con un secuenciador ABI PRISM 377 DNA sequencer de Perkin Elmer con oligonucleotidos para el plásmido pDrive, con el fin de conocer las secuencias nucleotídicas de los insertos clonados.

## 5.9. Análisis bioinformático

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos clonados, éstos fueron analizados con el software Chromas versión 2.33 (Copyright® 2003-2008, <http://www.technelysium.com.au>).

Cada secuencia se analizó en internet con el algoritmo "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST v2.0 , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) desarrollada por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) del gobierno de los U.S.A (Altschul y cols., 1997). Mediante las herramientas BLAST'n que compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos que contenga también secuencias nucleotídicas y el BLAST'x que traduce las secuencias en sus seis posibles marcos de lectura (aminoácidos) y compararlas ya traducidas contra una base de datos de proteínas; en ambos casos se considero un valor (E) menor a  $1e^{-3}$  como significativo. Además se utilizaron las bases de datos genómicas de *Ustilago maydis* y *Arabidopsis thaliana* ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis)) ([www.genomenetwork.org/articles/04\\_00/what\\_makes\\_chart.shtml](http://www.genomenetwork.org/articles/04_00/what_makes_chart.shtml)).

Una vez que se obtuvo la secuencia completa, se realizaron alineamientos múltiples con las homólogas pertenecientes a otros organismos registrados en la base datos del NCBI y se desarrollaron árboles filogenéticos con la herramienta *Megalign* del paquete bioinformático *Lasergene*® v8. 0 de *DNASTAR*.

Con base en los alineamientos múltiples se diseñaron oligonucleótidos específicos con la herramienta *Primer select* del paquete bioinformático *Lasergene*® v8.0 de *DNASTAR*, correspondientes a la secuencia de *Ustilago maydis*

seleccionada que un análisis bioinformático mas exhaustivo, el diseño de estos fue con el fin de ser utilizados para el análisis de expresión del gen mediante RT-PCR.

### **5.10. Análisis de expresión por RT-PCR de un gen diferencial**

Para comprobar y dar seguimiento a la expresión diferencial de la biblioteca substractiva se seleccionó uno de los genes para un análisis de expresión por RT-PCR a diferentes tiempos posteriores a la inoculación de *A. thaliana* con *U. maydis*. En este caso se utilizaron dos etapas del desarrollo de *A. thaliana* para su inoculación, una a tiempo temprano de desarrollo en donde la planta es mas susceptible a la infección (11 días posteriores a la germinación [dpg]) y otro a tiempo tardío del desarrollo en donde la planta es más resistente a la infección (18 dpj). Se tomaron muestras a las 24, 72, 120 y 168 hpi para la etapa uno, a las 24 hpi para la etapa 2 y de 24h para *U. maydis* cultivado *in vitro*. En cada caso se llevó a cabo extracción de ARN; para obtener los transcritos se utilizó amplificación por RT-PCR en dos pasos, en el primero se utilizó RT con oligo dT para obtener el ADNc, y después PCR con los oligos específicos para amplificar el fragmento correspondiente al gen.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Escrutinio de clones**

#### **6.1.1. Selección de clonas positivas y porcentaje de transformación**

Para el crecimiento de células transformantes se realizaron dos diluciones una de 50  $\mu\text{L}$  y otra de 80  $\mu\text{L}$  (Figura 10). Se contaron 286 clonas de ambas diluciones, en la primera dilución (50  $\mu\text{L}$ ) se obtuvo un total de 191 clonas de las cuales 109 fueron positivas (57%), de la segunda dilución (80  $\mu\text{L}$ ) se obtuvieron 95 clonas de las cuales 72 fueron clonas positivas (76%) (Figura 11); lo que nos lleva a un total de 181 clonas positivas (63.28%) contra 105 clonas negativas (36.71%) (Figura 12).

#### **6.1.2. Verificación de clonas positivas por presencia de plásmidos**

Una vez aisladas las 181 clonas positivas (blancas) se procedió a verificar la presencia del plásmido. Se utilizaron 96 clonas (53%) de las 181; se observó que 91 clonas presentaron bandas correspondientes a la presencia del plásmido recombinante (Figura 13 y 14). Las clonas que no presentaron bandas visibles (5 clonas) se descartaron.

#### **6.1.3. Verificación de la presencia y tamaño de insertos**

A partir de las 91 clonas que se confirmaron positivas en el análisis de plasmidos, 56 fueron utilizadas para amplificar el inserto por PCR. Cada producto de PCR fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con el fin de confirmar la presencia y el tamaño aproximado de cada fragmento. Se confirmaron 52 fragmentos por PCR (Figura 15), los tamaños de éstos se presentaron entre los 100 y 1000 pares de bases (pb). La mayor cantidad de fragmentos se encontraron entre 200 (23%) y 300 pb (37%) del total de clonas analizadas (Figura 16).



Figura 10. Clonas obtenidas por Hibridación Substractiva del patosistema *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana* a las 72 hpi. A la izquierda se muestran los resultados de la transformación de células de *E. coli* en placas de medio selectivo LB (CB, IPTG y Xgal) en donde se observa la diferencia entre colonias azules (negativas) y colonias blancas (positivas). A la derecha selección y recuperación de colonias positivas. Las flechas señalan las colonias blancas (clonas transformantes con inserto); en azul las clonas negativas (No presentan inserto).

### Comparación de clonas positivas por dilución

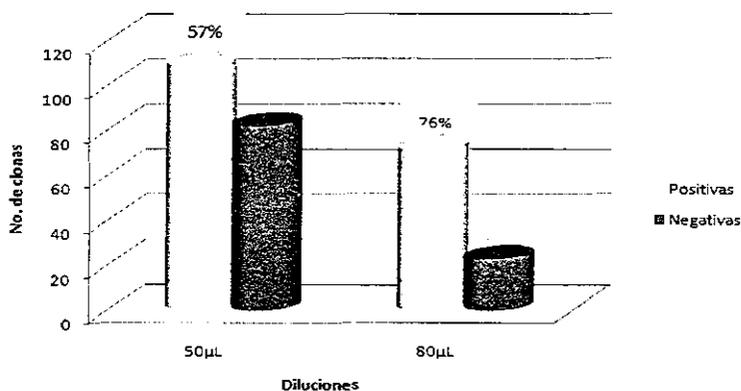


Figura 11. Representación gráfica de clonas obtenidas por Hibridación Substractiva. Clonas positivas (barras blancas) contra las negativas (barras azules) de acuerdo a la dilución 50 y 80 µL respectivamente.

## Porcentaje de transformación

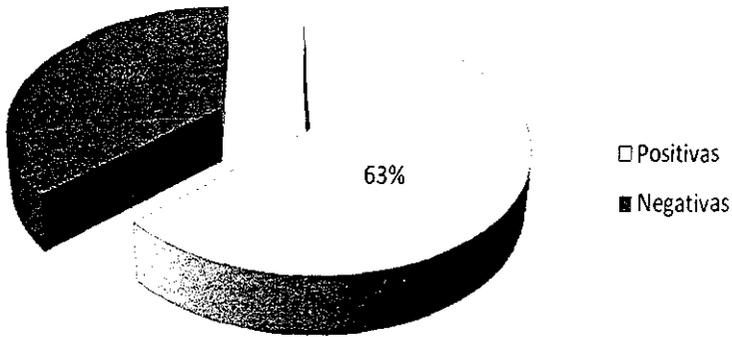


Figura 12. Distribución porcentual de los resultados de transformación de las clonas obtenidas en la biblioteca substractiva a las 72 hpi utilizando el patosistema *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana*. En gris el % de clon positivas (con inserto), en azul el % de clonas negativas (sin inserto)

## Verificación de clonas positivas por presencia de plásmidos recombinantes en gel de Agarosa

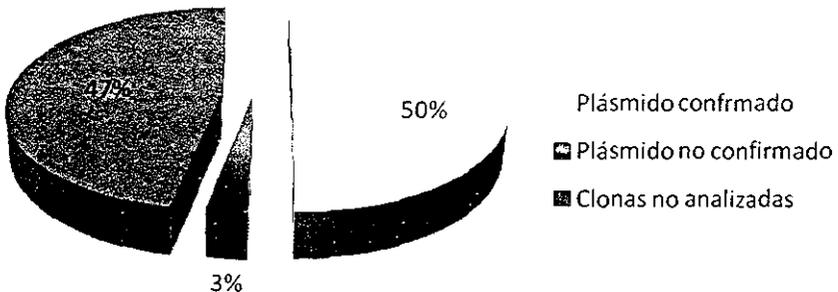


Figura 13. Gráfico de porcentajes obtenidos sobre los resultados de clonas confirmadas con presencia de plásmidos por PCR y corrimiento electroforético en gels de agarosa al 1.2%. Se consideró el porcentaje obtenido del total parcial analizado

Pb Mm 2 3 4 5 6 7 8

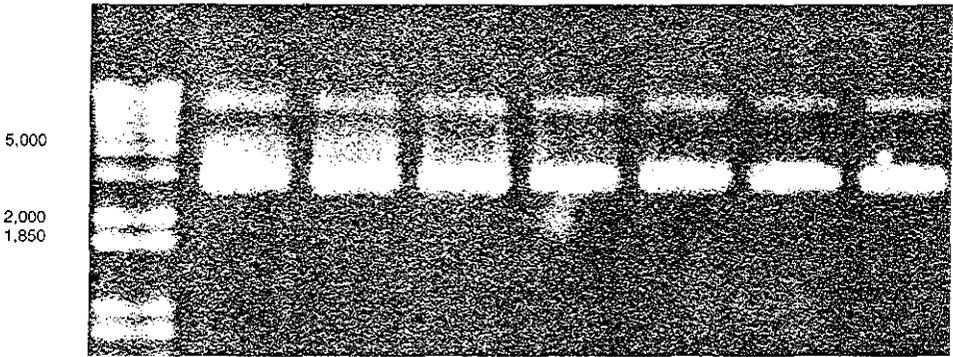


Figura 14. Verificación de la presencia de ADN plasmídico extraído por lisis alcalina a partir de las clonas positivas (blancas) obtenidas del banco subtractivo a las 72 hpi del patosistema *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana* por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Línea 1, marcador de peso molecular de 1 Kb (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); Líneas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 ADN plasmídico extraído de diferentes clonas positivas.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

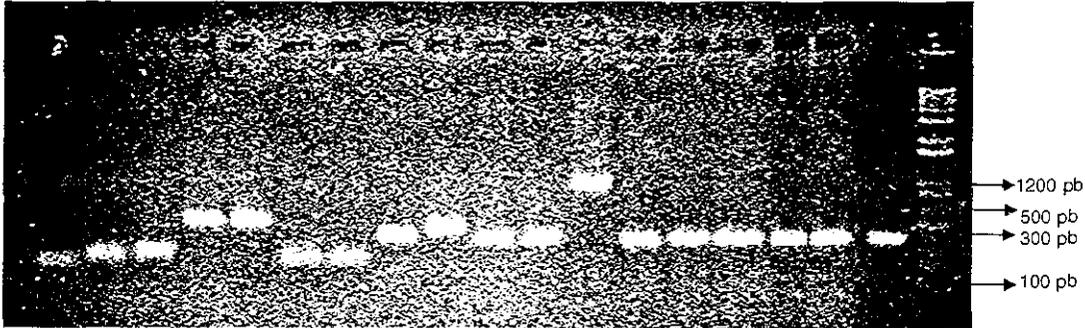


Figura 15. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.2% en donde se muestra el tamaño de los fragmentos obtenidos determinados por PCR. El PCR se llevo a cabo utilizando los oligonucleótidos específicos Nested 1 y Nested 2 del paquete "PCR select cDNA subtraction Kit" (CLONTECH®). Líneas 1 a 18 se presentan los productos de PCR de 18 clonas diferentes; Línea 19. Marcador de peso molecular 1 Kb (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

## 6.2. Análisis Bioinformático de secuencias

### 6.2.1. Secuenciación

De las 181 clonas positivas obtenidas en la biblioteca substractiva se seleccionaron 144 para secuenciarlas. De las secuencias obtenidas se descartaron seis debido a que no fue posible analizarlas, por lo tanto se sometieron sólo 138 al análisis bioinformático. Para el análisis de cada secuencia se procedió a buscar cada uno de los adaptadores utilizados que deben de estar flanqueando al fragmento clonado (5'-TCGAGCGGCCGCGGGCAGGT-3' [sentido]; 5'-ACCTGCCCGG GCGGCCGCGGA-3' [antisentido complementario] en la cadena 3' ó 5'-AGCGTGG TCGCGGCCGAGGT-3' [antisentido] 5'-ACCTCGGCCGCGACC-3' [sentido complementario] en la cadena 5'), de tal manera que únicamente la secuencia que pertenece al fragmento clonado se sometió al análisis bioinformático (Figura 17).

### 6.2.2. Análisis BLAST'n

El total de las clonas (138) se analizó con la herramienta BLAST en la modalidad de nucleótidos (BLAST'n) considerando un alineamiento significativo cuando el valor del error (E) era menor a  $1E^{-3}$ . Se obtuvieron 106 secuencias con identidad al genoma de *Arabidopsis thaliana* (77%), de los cuales representan a 35 genes diferentes (Figura 18-A), y 22 secuencias tuvieron identidad al genoma de *Ustilago maydis* (16%) correspondientes a 19 genes diferentes (Figura 18 B), y las otras 10 secuencias no presentaron alineamiento significativo con alguno de los dos organismos (7%) (Figura 20).

### 6.2.3. Análisis BLAST'x

Todas las secuencias obtenidas (138) fueron alineadas con la herramienta BLAST en la modalidad que traduce la secuencia de nucleótidos a aminoácidos y se

comparó con la base de datos perteneciente a proteínas (BLAST'x), se consideró el alineamiento significativo cuando el error (E) era menor a  $1e^{-3}$ . Se obtuvieron 106 secuencias con identidad al genoma de *Arabidopsis thaliana* (77%) que representan 35 genes diferentes (Figura 19-A), y 25 secuencias presentaron identidad con secuencias de *Ustilago maydis* (18%) que codifican para 21 genes diferentes (Figura 19-B), y 7 secuencias no presentaron alineamiento significativo (5%) los cuales se descartaron (Figura 20).

#### **6.2.4. Secuencias con identidad al genoma de *Ustilago maydis***

En la tabla 1 se muestran las 25 secuencias analizadas con la herramienta BLAST'x (no redundante) que codifican para 21 proteínas con identidad ( $<1e^{-3}$ ) al genoma de *U. maydis* y su probable función reportada en otros hongos.

La categoría funcional de cada uno de los genes resultó de la siguiente manera: se obtuvieron 4 proteínas en la categoría de metabolismo (19%), 2 en la categoría de energía (9%), 1 en la categoría de transcripción (5%), 3 en la categoría de síntesis proteica (14%), 1 en la categoría de respuesta celular, estrés y virulencia (5%), y 9 proteínas en la categoría de proteínas con función desconocida (43%) (Figura 21).

A partir de los 21 genes diferenciales de *U. maydis* encontrados en la biblioteca substractiva (Tabla 1), se eligió la clona U1H12 para hacer mas exhaustivo su estudio, ya que el inserto presentó alta identidad con el gen *Umf1* de *U. maydis*. Dicho gen que no ha sido descrito aún, podría tener la misma función que la enzima myo-inositol-hexankisfosfato 3-fosfohidrolasa al igual que lo reportado en otros hongos con los que también presentó identidad.

#### **6.3. Análisis bioinformático del gen *Umf1* (3-fitasa) de *Ustilago maydis***

La clona U1H12 (192 pb) se sometió a un alineamiento BLAST'x (no redundante) el cual presenta una identidad del 100% y un valor E de  $6e^{-11}$  con el gen *Umf1* de *Ustilago maydis* (Figura 22); así mismo presenta una identidad del 80% con genes que codifican para la enzima myo-inositol-hexankisfosfato3-fosfohidrolasa en organismos como *Agrocybe pediades*, *Aspergillus japonicus* y *A. oryza* (Tabla 2).

De acuerdo a la base de datos NCBI se obtuvo la secuencia completa del gen *Umf1* de *U. maydis*. La secuencia completa del gen se sometió a un alineamiento BLAST'x en el NCBI, el cual reportó 150 secuencias similares, de estas se utilizaron solo aquellas que presentaron un 60% o más de identidad, entre las cuales se localizaron 12 que pertenecen a hongos, las cuales se detallan en la tabla 2. El análisis de secuencias del gen *Umf1* describe un marco de lectura abierto de 1441 pares de bases (pb), y su producto génico es una proteína de 483 a.a, de los cuales 41 son a.a. básicos, 42 a.a. ácidos, 169 a.a. hidrofóbicos, y 141 a.a. polares. La traducción del gen se obtuvo utilizando dos fuentes, el programa DNASTAR de Lasergene y la base de datos MIPS de *U. maydis* en la internet; en ambos se obtuvo la misma secuencia de aminoácidos.

Con el fin de tener un comparativo de secuencias entre genes de fitasas se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de cada gen que presentaron una mayor identidad en el análisis bioinformático y que pertenecen a otros organismos como bacterias (*Bacillus subtilis*) plantas (*Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*) y hongos (Tabla 2). Mediante el programa *Megalign* se realizó un alineamiento entre las secuencias, en el cual se muestran zonas altamente conservadas entre las secuencias de hongos. Las zonas con base a su secuencia de aminoácidos "LSPFC" y "NELIART", fueron las más conservadas entre las secuencias de hongos comparadas, en la figura 23 se muestra un fragmento del alineamiento en donde se esquematiza claramente las zonas comparadas entre las secuencias de aminoácidos.

Para confirmar que *Umf1* se agrupa dentro de las fitasas de hongos se llevó a cabo una comparación de secuencias para el diseño de un árbol filogenético con base a las diferencias entre secuencias (Figura 24). Se pudieron establecer dos grupos principales, el primero es donde se encuentran las fitasas de hongos incluyendo *U. maydis*, bacterias y el de la planta como es el maíz (*Zea mays*) y en el segundo grupo se localizaron las secuencias correspondientes a *Arabidopsis thaliana*. En las divisiones subsecuentes se observó que las fitasas de bacterias presentan una diferencia de aproximadamente 220 pb con respecto a las fitasas de origen fungica, mientras que la fitasa de maíz presenta una separación menor de 180

## Comparación de fragmentos obtenidos

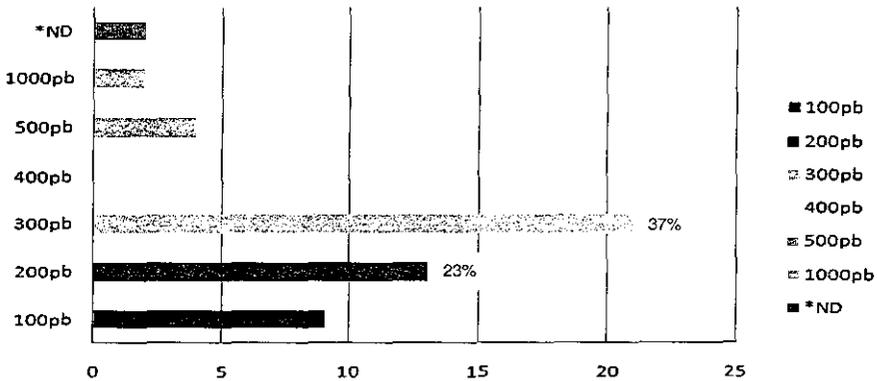


Figura 16. Comparación del tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR y análisis electroforético en geles de agarosa. Se presenta el número de veces de clonas obtenidas por tamaño de fragmento; 9 de 100 pb, 13 de 200 pb, 21 de 300 pb, 5 de 400 pb, 4 de 500 pb, 2 de 1000 pb, y 2 no determinadas (ND). La mayor cantidad de fragmentos obtenidos presentan una longitud de 200 y 300 pb representando un 23 y 37% del total parcial analizado.

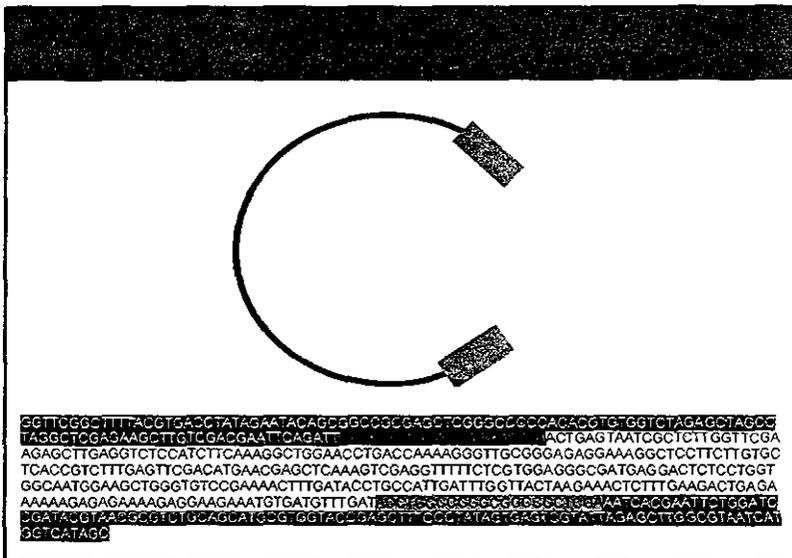


Figura 17. Escrutinio de las secuencias obtenidas con el fin de definir el inserto clonado. Se representa la secuencia de la clona U1-H12; en negro, se representa la secuencia del plásmido pDRIVE; en morado, secuencia del adaptador 1; en verde, secuencia del adaptador 2R; en amarillo, secuencia del fragmento clonado.

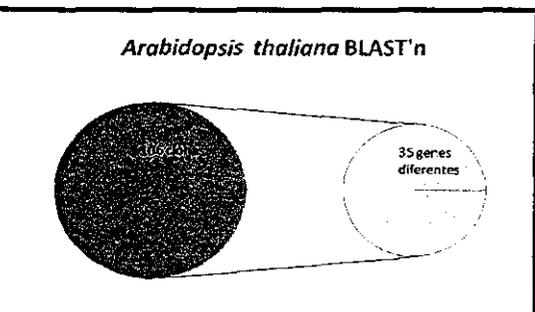


Figura 18-A. Diagrama que representa a la cantidad de secuencias y genes diferentes que presentan identidad con el genoma de *Arabidopsis thaliana* utilizando la herramienta BLAST'n

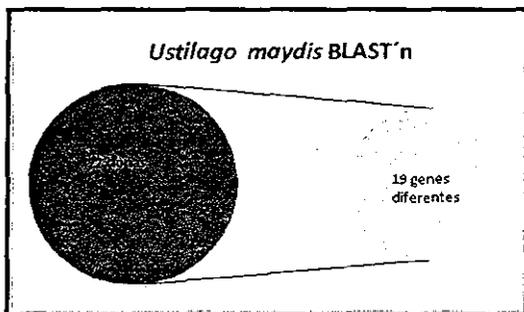


Figura 18-B. Diagrama que representa a la cantidad de secuencias y genes diferentes que presentan identidad con el genoma de *Ustilago maydis* obtenidos utilizando la herramienta BLAST'n

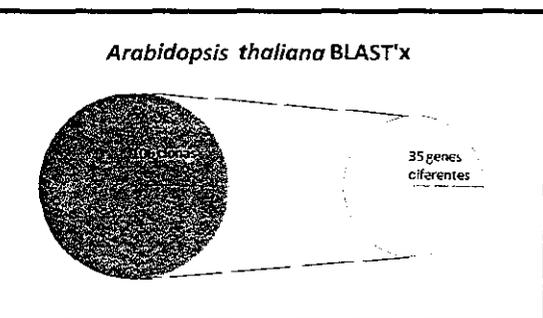


Figura 19-A Diagrama que representa la cantidad de secuencias y el total de genes representados que fueron obtenidos utilizando la herramienta BLAST'x, que tienen identidad a genes de *Arabidopsis thaliana* obtenidos.

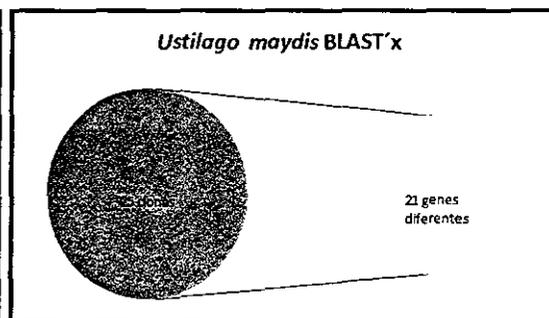


Figura 19-B Diagrama que representa la cantidad de secuencias y el total genes representados que fueron obtenidos utilizando la herramienta BLAST'x, que tienen identidad a genes de *Ustilago maydis*.

## Comparación de clones codificantes en base al algoritmo BLAST utilizado

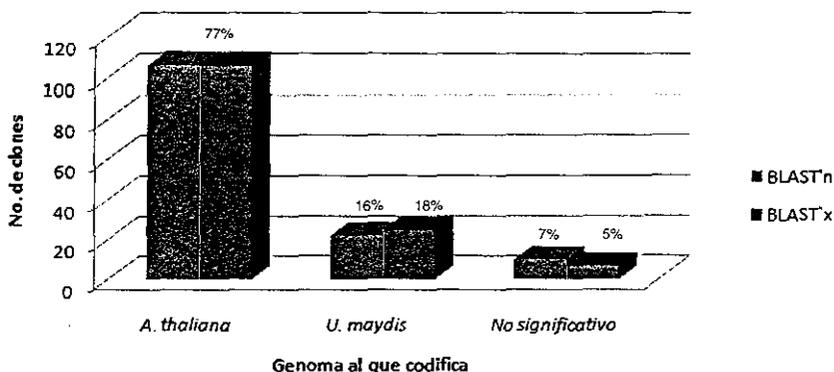


Figura 20. Gráfica que compara la distribución porcentual de secuencias analizadas con el algoritmo BLASTn y BLASTx con un error de  $1e^{-3}$ . Los porcentajes se calcularon en base al total de secuencias alineadas (138) con respecto al alineamiento positivo para los genomas de *A. thaliana* y *U. maydis*.

## Distribución de las categorías funcionales



Figura 21. Distribución de las categorías funcionales de las proteínas correspondientes a *Ustilago maydis* en base al programa FUNCAT de la base de datos MIPS. Los porcentajes fueron calculados en base al número total de proteínas alineadas (21). La función fue determinada en base a los alineamientos significativos que se obtuvieron con la herramienta BLASTx de la base de datos GeneBank no redundante.

**Tabla 1. Secuencias con identidad al genoma de *Ustilago maydis***

Clona	Error	Identidad con	Función	Reportado en:	puede participar en patógenesis	homocultura utilizada
U1E4	1e <sup>20</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	D-arabinitol 2-dehidrogenasa	<i>Laccaria bicolor</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> ,	SI	Um1
U1E12, U2A8 U2C4, U2G2 U2H1, U2H3 U2B5, U2H7	5e <sup>09</sup> , 3e <sup>-06</sup> , 1e <sup>-3</sup> , 4e <sup>-2</sup> , 9e <sup>-03</sup> , 2e <sup>-12</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Proteína hipocifética	¿?	NA	NA
U1F1	3e <sup>-07</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Proteína disulfuro isomerasa	<i>Alternaria alternata</i> <i>Botrytis cinerea</i>	SI	Um2
U1F4	5e <sup>-30</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Factor intercambiador de guanina ribo	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Debaryomyces nansenii</i> <i>Candida glabrata</i>	NO	NA
U1F6, U1H9 U2B7	4e <sup>-44</sup> , 6e <sup>-27</sup> , 2e <sup>-26</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Proteína L7 Subunidad ribosomal 60S Subunidad ribosomal 18S Proteína ribosomal Subunidad 40S	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	NO	NA
U1F9	2e <sup>-39</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	O-acetilhomoserina sulfhidrolasa/ O-acetilsierina sulfhidrolasa	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Coccidioides immitis</i>	NO	NA
U1G3	2e <sup>-12</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Glucose-6-Fosfato 1-dehidrogenasa	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	NO	NA
U1H12	6e <sup>-11</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	myo-inositol hexafosfato fosfodihidrolasa 3-ilisasa	<i>Aspergillus japonicus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Agroclybe pediculus</i>	SI	Um1f
U2A10 U2B12	2e <sup>-77</sup> , 9e <sup>-57</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	C-14.sterol. reductasa (Erg24) ATPasa complejo remodelador de cromatina	<i>Schizosacharomices pombe</i>	SI	Um3
U2C2 U2C3	1e <sup>-04</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Fostglicolato Fosfatasa	<i>Faleobacter sp</i>	NO	NA
U2C9	2e <sup>-39</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Isocitrato dehidrogenasa dependiente de NAD mitocondrial	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	NO	NA
U2F8, U1H11	3e <sup>-37</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Proteína de choque térmico (Hsp70)	<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>	SI	Um4
U2G9	2e <sup>-12</sup>	<i>Ustilago maydis</i>	Guanosina Difosfatasa	<i>Ustilago hordei</i>	NO	NA

**Tabla 2 Secuencias homologas a fitasas a fitasas con mayor porcentaje de identidad utilizadas para posteriores alineamientos**

Nombre	Especie a la que pertenece	Porcentaje de identidad(%)
Fitasa	<i>Talaromyces thermophilus</i>	60%
Precursor A Fitasa 3	<i>Aspergillus terreus</i>	60%
Precursor A Fitasa 3	<i>Aspergillus oryzae</i>	61%
Fosfatasa Acida A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	60%
Precursor B Fitasa 3	<i>Aspergillus nidulans</i>	61%
Fitasa	<i>Aspergillus clavatus</i>	61%
Precursor Fitasa	<i>Periophora lycii</i>	61%
Fitasa Neutral	<i>Aspergillus sp</i>	60%
Precursor Fitasa	<i>Agriocybe pedicels</i>	61%
Fitasa	<i>Aspergillus ficuum</i>	60%
Precursor A Fitasa	<i>Aspergillus niger</i>	60%
Fitasa	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	61%



Figura 22. Alineamiento del gen *Umf1* de *Ustilago maydis*, y la secuencia de nucleótidos correspondiente a un fragmento obtenido de la clona U1H12, que fue aislado mediante una biblioteca substractiva a las 72 hpi usando el patosistema *Ustilago maydis*-*Arabidopsis thaliana*. Se utilizó la herramienta *Megaline* del programa bioinformático *Lasergene v8.0.* de DNASTar

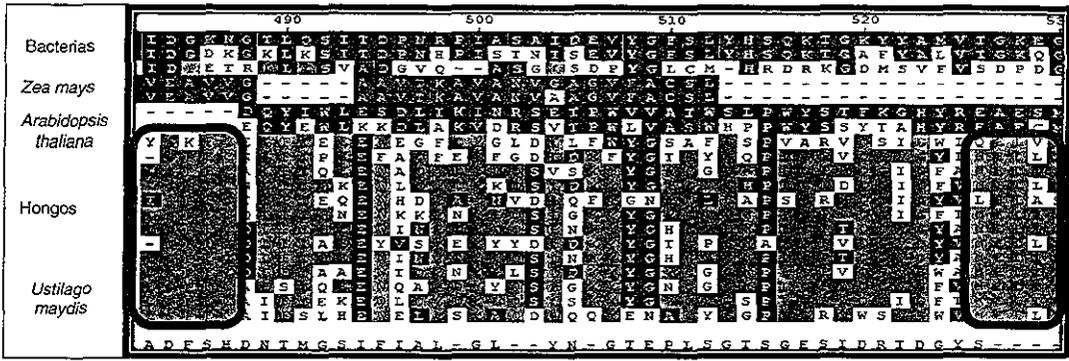


Figura 23. Alineamiento múltiple de varias fitasas, en rosa fitasas de bacterias, en verde fitasas de *Zea mays*, en rojo fitasas de *Arabidopsis thaliana*, en azul fitasas de varios Hongos, en amarillo *Umf1* de *Ustilago maydis*. Los rectángulos rojos encierran las zonas altamente conservadas.

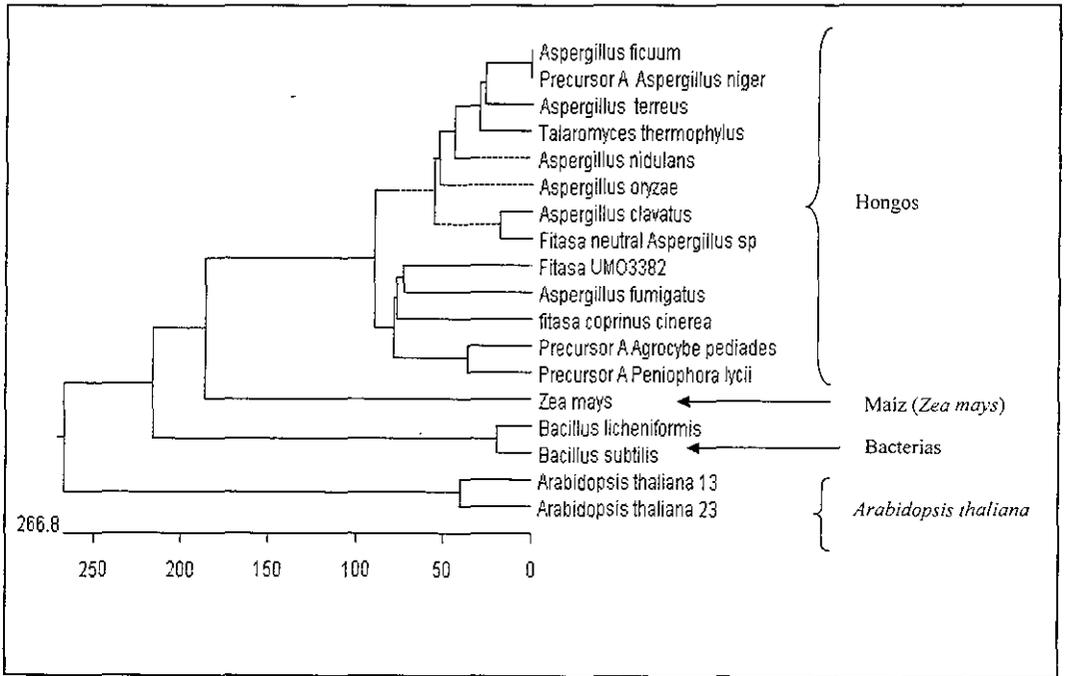


Figura 24. Árbol filogenético que muestra la relación de parentesco del gen *Umf1* de *Ustilago maydis* con otras secuencias de fitasas de diversos organismos. En rojo se presenta la ubicación de la secuencia de *Umf1* en el grupo de las fitasas de hongos, con mayor parentesco a la fitasa de *Aspergillus fumigatus*.

pb. Por otro lado el gen *Umf1* se ubica dentro del grupo de hongos mostrando mayor parentesco con la secuencia representada por *Aspergillus fumigatus*.

### 6.3.1. Diseño de oligonucleótidos específicos

Los oligonucleótidos específicos diseñados para la secuencia del gen *Umf1* de *U. maydis*, flanquean el gen desde la posición 91 hasta la 1337, y amplifican un fragmento de 1247 pb (Figura 25). El oligonucleótido sentido tiene una longitud de 21 bases nitrogenadas; su lectura es la siguiente: 5'-GTCGATCCGCAAGTCCTCACC-3' y presenta una temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de 58.1 °C. El oligonucleótido antisentido se compone de 23 bases nitrogenadas, su lectura se presenta a continuación: 5'-CTGCACTCCTTCAAGCC CGATAG-3', presenta una  $T_m$  de 58.9 °C. La diferencia entre las dos  $T_m$  es de 0.8 y su  $T_m$  optima fué de 58.6°C. El programa de amplificación de PCR se describe a continuación 94°C durante 2 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 58.6°C por 30 s, 72°C por 1 min y finalmente la extensión por 5 min a 72°C.

### 6.4. Análisis de expresión por RT-PCR del gen *Umf1* de *Ustilago maydis*

El análisis por RT-PCR reveló que la expresión del gen *Umf1* no se expresa constitutivamente cuando *U. maydis* se encuentra en esporidias (fase no patogénica); sin embargo cuando *U. maydis* infecta a *A. thaliana* (11 dpv) se observa una amplificación perceptible de *Umf1* a las 72 hpi, incrementándose paulatinamente conforme avanza la infección. Por otro lado cuando *A. thaliana* es mas resistente a la infección (18 dpv) por *U. maydis* la expresión del gen *Umf1* se incrementa en mayor proporción al ser comparado con los resultados obtenidos en las plantas más susceptibles a la infección (11 dpv). Por otro lado los controles de *A. thaliana* sin inocular a los mismos tiempos de crecimiento no mostraron amplificación del gen (lo que demuestra la especificidad de los oligonucleótidos).

El control de carga de ADNc para *A. thaliana* se presentó en forma constante a lo largo de la infección (Figura 26).

```

          GT CGAT CCGCAAAGT CCT CACC
*GGT CT ACCGGT CGAT CCGCAAAGT CCT CACCAGCTTT G GCAGT GCTT CCGCT AT CGGGCTT GAAGGAGT GCAGCGT T CAGACG
CCAGAT GGCCAGCT A.GGCGTT CAGGAGT GGT CGAAAC CGT CACGAAAGCGAT A.CCCCGAACT T CCT CACGT CGCAAAGT CT GC
          GAT AGCCCGAACT T CCT CACGT C
-----
          100                               1320                               1340
-----
*GGT CT ACCGGT CGAT CCGCAAAGT CCT CACCAGCTTT G GCAGT GCTT CCGCT AT CGGGCTT GAAGGAGT GCAGCGT T CAGACG

```

Figura 25. Alineamiento entre los oligonucleótidos diseñados y la secuencia del gen *Umf1* de *Ustilago maydis*, mediante el uso de la herramienta bioinformática *primer select* del software *Lasergene*® de DNAsar. En verde secuencia 5'-3' y en rojo secuencia complementaria.

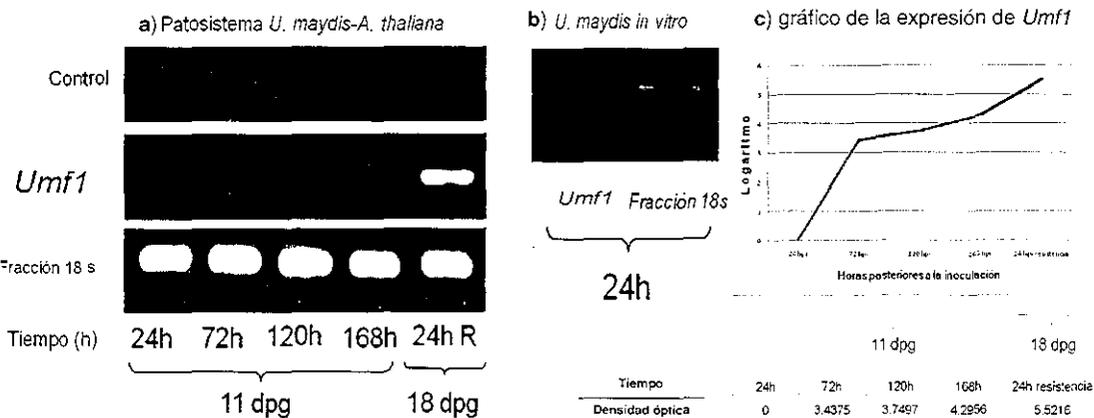


Figura 26. Análisis de expresión por RT-PCR del gen *Umf1*. a) Se muestra el corrimiento electrofórico en gels de agarosa de la expresión de *Umf1* por RT-PCR a las 24, 72, 120 y 168 hpi de plántulas de 11 dpv, y a las 24 hR de plántulas de 18 dpv; b) Se muestra el corrimiento electrofórico en gels de agarosa de la expresión por análisis RT-PCR del gen *Umf1* en *U. maydis* cultivado in vitro; c) Representación gráfica de la expresión del gen *Umf1* durante la infección (línea naranja), datos obtenidos en base a intensidad de banda comparando control y problema, el valor numérico máximo (5.5216) es obtenido a las 24hR (línea roja). *Ustilago maydis* fue inoculado en plántulas de *A. thaliana*. de 11 dpv y 18 dpv, fueron inoculadas con 0.5  $\mu$ L de una dilución de  $10^8$  esporidias/mL, el tejido fue ultracongelado para la extracción de ARN total. Los controles de *A. thaliana* se inocularon con 0.5  $\mu$ L de agua estéril. Los números indican las horas posteriores a la inoculación. Se utilizó como control de carga de ARN el fragmento de la subunidad ribosomal 18S de *A. thaliana* y el 18S de hongos para *U. maydis*.

## 7. DISCUSIÓN

El patosistema modelo "*Ustilago maydis*-*Arabidopsis thaliana*" establecido por Méndez-Morán y cols., (2005), y la técnica de Hibridación Substractiva (Diatchenko y cols., 1996) que han sido utilizados como herramienta en el estudio de genes diferencialmente expresados (Mendez-Moran, 2004), fueron aplicados en el presente estudio para encontrar información relacionada con los cambios de expresión génica de *U. maydis* durante la interacción con su huésped no natural *A. thaliana* en un tiempo temprano a la infección. La biblioteca substractiva cuenta con 181 clonas (60% de transformación), de las cuales más del 70% presentaron inserto evidenciado por PCR. Mediante el análisis de secuencias se pudo verificar que el origen corresponde a genes de *U. maydis* o de *A. thaliana*, de tal manera que la biblioteca substractiva se puede considerar como significativa; estos resultados están dentro del rango reportado previamente por otros autores el cual oscila entre 50 y 95% de clones con inserto (Ji y cols., 2002; Cramer y Lawrence, 2003; Palomino-Hermosillo, 2008), cabe mencionar que se utilizaron diferentes vectores de clonación en estos estudios.

Al realizar el análisis bioinformático BLAST'n se localizaron 22 secuencias con identidad significativa al genoma de *U. maydis* (19 genes); no obstante al llevar a cabo un análisis con la herramienta BLAST'x se encontró que 25 secuencias presentaban similitud significativa a transcritos de estos genes de *U. maydis* (21 genes), esta diferencia numérica es debido a que las secuencias U1F1, U2A8 y U2H7 al ser sometidas al análisis BLAST'n no presentaban similitud, al contrario cuando se sometieron al análisis BLAST'x presentaron similitud con alguno de los transcritos de genes de *U. maydis* (Ver figura 20). Cuando se lleva a cabo el análisis de estas secuencias en una base de datos genómicos (BLAST'n), la comparación de secuencias corresponde a mínimos fragmentos genómicos del gen dando como resultado un alineamiento no significativo, pero no por eso se descarta la información ya que se encuentra una relación con algún gen. Se obtuvo un mejor resultado al

realizar el análisis por comparación de transcritos por BLAST´x, con un valor de identidad mayor debido a que se utiliza una matriz de sustitución más efectiva.

Entre los genes identificados de *U. maydis* cuya función puede estar relacionada con el proceso patogénico del hongo en *A. thaliana*, se encuentran los siguientes:

La clona U1E4 tiene identidad con una proteína D-arabinotol 2 deshidrogenasa (*Um1*) reportada en los hongos: *Aspergillus oryzae*, *Yarrowia lipolytica* y *Laccaria bicolor*; se ha descrito que la proteína D-arabinotol 2 deshidrogenasa podría estar implicada, al igual que otros polioles como el glicerol, sorbitol y manitol, en una respuesta frente a estrés osmótico u oxidativo como reserva de fuente de carbono o incluso como “válvula de escape” frente a un exceso del potencial reductor en la célula en el hongo dimórfico *Candida albicans* (Gola y Pla., 2005). Por lo anterior, en el presente trabajo podemos inferir que la expresión del gen *Um1*, se da en respuesta al estrés oxidativo determinante en la respuesta de defensa de la planta al ataque del patógeno.

La clona U1F1 tiene identidad con una enzima disulfuro isomerasa (PDI; *Um2*) reportada en *Alteranaria alternata* y *Botrytis cinérea*. Esta enzima cataliza las reacciones de oxido reducción e isomerización de enlaces disulfuro en los polipéptidos nacientes (Wilkinson y Gilbert, 2004), ayudando a estabilizar la estructura terciaria o cuaternaria de muchas proteínas (Seviers y Kaiser, 2002). En organismos como *Entamoeba histolytica* y *Clamydia trichomatis*, el plegamiento correcto de los enlaces disulfuro y su apareamiento con los residuos de cisteína son indispensables para algunos factores de virulencia y proteínas involucradas en mecanismos de adhesión y destrucción de tejidos (Ramos y cols., 2005; Abromaitis y Stephens, 2009). El hecho de que *Ustilago maydis* exprese este tipo de proteínas que presentan una actividad PDI, sugiere una función relevante durante los mecanismos de patogénesis del hongo e invasión de los tejidos de su huésped.

La clona U2A10 tiene identidad con la enzima C-14 esterol reductasa (*Um3*) reportada en *Schizosaccharomices pombe*, esta enzima esta encargada de reducir el

4,4 dimetilergosta-8,14,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol a 4,4 dimetilergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol durante la biosíntesis del ergosterol (el principal lípido constituyente de la membrana plasmática en hongos) (Paltauf y cols., 1992). La ruta metabólica del ergosterol es única para hongos y es indispensable, pues en levaduras mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* en esta ruta metabólica resultan inviables (Bard y cols, 1993; Kaneshiro, 2002). Es bien conocida la ruta del ergosterol como blanco para la creación de fungicidas debido a que una alteración en los componentes de esta ruta metabólica desemboca en la imposibilidad o reducción de la producción de ergosterol, esto a su vez altera la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática (Lupettit y cols., 2002; Leber y cols., 2003). La presencia de este gen diferencial en el proceso patogénico de *U. maydis* puede deberse a un incremento en la síntesis de ergosterol necesario para constituir la membrana plasmática del hongo, dado que el mecanismo de defensa del huésped afectaría considerablemente su pared celular, o bien es un indicativo de un incremento en el crecimiento invasivo del hongo en el tejido de la planta.

Otro gen expresado diferencialmente y muy relacionado a estrés, es el *Um4* (clonas U2F8 y U1H11), que tiene identidad con una proteína de choque térmico (heat shock protein [Hsp70]) reportada en *Aspergillus clavatus*, *Schizosacharomyces pombe*, *Neurospora crassa* y *Rhizopus stolonifer*. Como es bien sabido estas pequeñas proteínas están relacionadas a diferentes tipos de estrés en organismos tanto procariotas como eucariotas (Santoro, 2000). Mayer y Bukau (2005) demostraron que un incremento en la expresión de Hsp70 repercutía directamente en un decremento en el proceso de muerte celular programada (apoptosis). A las 72 hpi *A. thaliana* presenta zonas necróticas lo que sugiere la utilización de un mecanismo de defensa, dicho ataque provoca un estrés en el hongo, el cual dado los resultados obtenidos (probable expresión de la proteína Hsp70) y la literatura citada, sugieren la utilización de esta proteína como defensa del hongo contra el ataque del huésped. Por otro lado las Hsp70 también actúan como “chaperonas” ayudando al correcto plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas, sobre todo aquellas sintetizadas en la mitocondria y cloroplasto, de tal forma que una sobreexpresión de

dichas proteínas podría estar dada por un aumento en la necesidad de plegamiento, transporte de las proteínas existentes o de las de síntesis de *novο* (Tavaria M. y cols., 1996).

Y el gen *Umf1* que presenta identidad con la proteína myo-inositol-hexankisfosfato fosfohidrolasa (fitasa), esta proteína ha sido reportada en algunos hongos dimórficos como: *Magnaporthe griseae*, *Agrocybe pediades* *Aspergillus oryzae*, *A. terreus* y *A. fumigatus*; el gen *Umf1* de *U. maydis* presenta una secuencia de 1452 pb y se traduce a una proteína de aproximadamente 483 aminoácidos, que corresponde al tamaño promedio que se ha observado en otros genes homólogos ya reportados como en el caso de *A. fumigatus* (Liu, y Hao, 2004), *Rhizopus sp* (Ramachandran y cols., 2005), *Mucor racemosus* (Roopesh, 2006), *Thermoascus aurantiacus* (Nampoothiri, 2004) y *Myceliophora thermophila* (Mitchel, 1997).

Estas fitasas son una clase especial de enzimas que son capaces de hidrolizar el ácido fítico o fitato (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6,-hexakisfosfato) (Lei y Porres, 2003). El ácido fítico (Figura 27) es la mejor forma de almacenaje de fósforo en las plantas y se encuentra en las semillas, legumbres y en menor cantidad en el haz de las hojas; sin embargo es más conocido por tener una alta capacidad de unirse a minerales esenciales (ej. Ca, Mg, Fe,), atrapar aminoácidos, proteínas y azúcares, además de inhibir enzimas digestivas (Hasoouni y cols., 2006).

Se ha reportado una clasificación para las fitasas, la cuál tiene como base la defosforilación del ácido fítico en diferentes posiciones del anillo inositol, lo que causa diferentes isómeros e inositol fosfatos menores así como la actividad enzimática óptima en relación al Ph; agrupándolas en acidas (3-fitasas), neutras (4/6 fitasas) y alcalinas (5-fitasas) (B.-C.Oh y cols., 2002). El grupo más largo de fitasas, generalmente representado en hongos, es el de las 3-fitasas (también llamadas exógenas), la mayoría muestran homología a las fosfatasas  $\beta$ -laminar y fosfatasas histidina-ácidas. Las fitasas de origen fungico que pertenecen a la clase de histidina fosfatasas ácidas (HAPs por sus siglas en inglés) tienen dos subgrupos: algunos muestran amplia especificidad de substratos pero baja actividad específica para

ácido fítico mientras que otros se comportan al contrario (Bohn y cols., 2008). Todos los miembros de las HAPs comparten dos sitios activos conservados, los dominios RHGXRXRP y HD (Van Etten y cols., 1991) y la hidrólisis del metal libre del fitato en un rango de pH ácido; sin embargo no es necesario que compartan alguna región adicional similar (Maugenest y cols., 1997).

Las HAP's pueden iniciar la hidrólisis del ácido fítico en el carbono 3 o 6 del anillo inositol y producir *myo* inositol monofosfato (en particular Inositol 2-fosfato) como producto final (Figura 28)(Mullaney y Ullah, 2003; Greiner y Carlsson, 2006; Oh y cols., 2006).

En el alineamiento múltiple del gen *Umf1* de *U. maydis* con las secuencias de genes de fitasas homólogos obtenidas en la internet, muestran zonas altamente conservadas (motivos) lo que nos permite inferir que la secuencia tiene un parentesco con las secuencias alineadas (fitasas; Figura 23). *Umf1* se agrupa en el dendrograma dentro de las fitasas de hongos como: *A. fumigatus* *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. thermophilus*, etcétera; ésto sugiere que *Umf1* además de comportarse como Hexankisfosfohidrolaza, pertenece a la subfamilia de las 3-fitasas o Histidina fosfohidrolazas ácidas (Figura 24).

La presencia del gen *Umf1*, que expresa una enzima fitasa en *U. maydis*, sugiere que las fitasas podrían estar participando durante el proceso patogénico de este hongo como parte del metabolismo del inositol fosfato (InsP), en donde los productos de la degradación del ácido fítico (*myo*-inositol hexankifosfato [*myo* inositol menores]) juegan un rol crítico en diferentes rutas de señalización (Bohn y cols., 2008) y finalmente el ácido fítico puede actuar consecuentemente como precursor de componentes con esta actividad.

El análisis de expresión del gen *Umf1* por RT-PCR reveló una expresión del gen cuando *U. maydis* fue inoculado en plántulas de *A. thaliana* de 11 dpq, después de las 72 hpi, incrementado su expresión con respecto al tiempo de desarrollo de la

infección comparado con el control (plantas no inoculadas); pero esto no fue observado cuando se analizó la expresión de este gen en *U. maydis* cultivado *in vitro* bajo un estado levaduriforme (no patogénico). Por otra parte cuando se inocularon plántulas en estadio resistente, a los 18dpg, se presenta una sobre-expresión del gen *Umf1* superior al 100% con respecto a plántulas susceptibles de 11 dpg (Figura 26). Éstos resultados sugieren que el gen *Umf1* no se expresa de manera constitutiva o se expresa a niveles muy bajos en un cultivo de *U. maydis in vitro*. Se observó que el gen se sobre-expresa a partir de las 72 hpi incrementado su expresión conforme avanza la infección, posiblemente éste resultado se debe al aumento en la necesidad del producto génico, y el sustrato de esta enzima también se está incrementando. En el caso de las plántulas que presentan resistencia a la infección por *U. maydis* (18 dpg) en donde la expresión del gen *Umf1* presentó una sobre-expresión mayor al 100%, sugiere una relación en la expresión de este gen con respecto a los mecanismos de resistencia de la planta.

Al utilizar transgénicos de papa (*Solanum tuberosum*) y *A. thaliana* afectados en los niveles de ácido fítico, Murphy y cols. (2008) descubrieron que el ácido fítico es una molécula importante en la señalización ya que regula los niveles basales de expresión de genes de resistencia de plantas a virus, bacterias y hongos patógenos; de hecho la hipersensibilidad se describió como efecto de la deficiencia en el almacenamiento de ácido salicílico (SA) en plantas de *A. thaliana* afectadas en los niveles de ácido fítico (Murphy y cols., 2008), el SA representa a un compuesto ampliamente relacionado a la resistencia de plantas a hongos (Hsien-Jung y cols., 2001).

El hecho de que el ácido fítico sea una molécula con diversas funciones importantes para la célula (por ejemplo: a) confiere resistencia basal de plantas a patógenos e interactúa con la señalización por auxinas relacionada a la resistencia antibacteriana [Murphy y cols., 2008; Navarro y cols., 2006]; b) incrementa el desarrollo y homeostasis, mejora la respuesta a estrés y está involucrado en la reparación del ADN [Raboy V., 2007]; c) está relacionado con el procesamiento del ARN y el mecanismo de exportación de los ARNm [Shears, 2004]), hace del ácido fítico una

molécula diana excelente para los productos génicos de hongos patógenos, encargados de minimizar el mecanismo de defensa de los hospederos, sin embargo, un rol de las *myo*-inositol fosfatas en patogénesis de hongos aún no ha sido determinado.

Muchas bacterias gram negativas patógenos de animales o de plantas, han desarrollado un sistema especializado de secreción tipo III o proteínas de traslocación bacterial que les permite traslocar una enzima específica dentro de la célula de su hospedero eucariota, afectando la señalización de fosfolípidos, y esta a su vez, el tráfico intracelular de la membrana y la supervivencia de la célula (De Vinney y cols., 2000). En *Salmonella dublin*, por ejemplo, el gen *SopB* regula específicamente la conversión del D-inositol(1,3,4,5,6)P<sub>6</sub> en D-inositol(1,4,5,6)P<sub>4</sub> (Zhou y cols., 2001) y de esta manera altera el metabolismo *myo* inositol en su hospedero. Este mecanismo se conoce también en *Escherichia coli* (Cottrill y cols., 2002), *Pantoea agglomerans* (Greiner R., 2004), *Enterobacter cloacae* (Greiner R., 2005) y muchos miembros del género *Aeromonas* (Vitches-Saez, 2005).

Dado que *Umf1* es un gen que codifica para una enzima exógena (*myo* inositol fosfatasa) capaz de hidrolizar el ácido fítico, podría ser traslocada por *U. maydis* para interferir en el metabolismo *myo* inositol fosfato y bloquear la respuesta de defensa de *A. thaliana*. Aunque aún es necesario seguir trabajando sobre esta posibilidad, éste podría ser el primer reporte de enzimas traslocables en hongos patógenos involucrados en su mecanismo de patogenicidad.

En resumen los resultados en este trabajo demuestran la presencia de cinco genes de *Ustilago maydis* expresados diferencialmente o sobreexpresados a las 72 hpi en el patosistema *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana* que podrían tener relación al mecanismo de patogenicidad de *U. maydis*, como es el caso del gen *Umf1* que en este trabajo se pudo determinar una relación en su expresión con respecto al tiempo de infección de *U. maydis* en plantas de *A. thaliana*, así como la expresión de este gen con respecto a los mecanismos de resistencia de la planta.

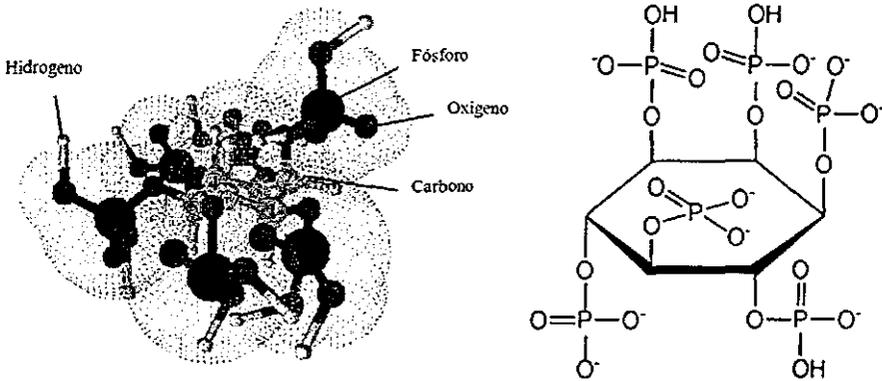


Figura 27. Estructura tridimensional y química del ácido fítico (myo-inositol-1,2,3,4,5,6- hexakisfosfato) (Lesson y Summers, 2001) Adaptado de Bohn y cols., 2008 (Software ChemSketch 10.0 ACCLabs.com).

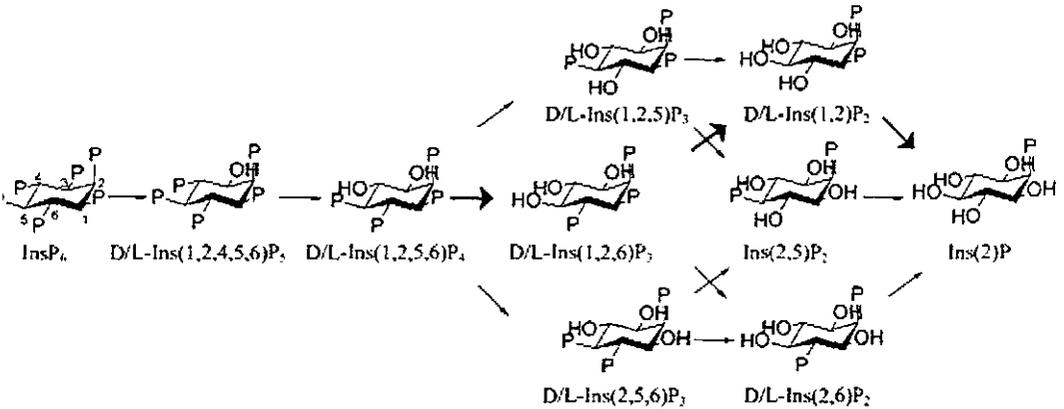


Figura 28. Defosforilación del ácido fítico por la 3-fitasa de *Saccharomyces cerevisiae*. La hidrólisis del ácido fítico inicia en el C3 del anillo inositol y los fosfatos adyacentes son removidos consecutivamente. El producto final es el Inositol 2 fosfato. En este esquema la P representa el fósforo inorgánico (Modificado de Greiner y cols., 2001).

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Se obtuvo una biblioteca substractiva con 21 genes diferentes para *Ustilago maydis* y 35 genes de *Arabidopsis thaliana*

2.- Las 25 secuencias que presentan identidad al genoma de *Ustilago maydis* codifican para 21 genes diferentes que representan distintas rutas relacionadas en el proceso metabólico y patogénico de *U. maydis* durante su interacción con su huésped durante la infección.

3.- La secuencia de la clona U1H12 corresponde al gen *Umf1* de *Ustilago maydis* que tiene un valor alto de similitud con el gen que expresa a la enzima *myo*-inositol hexankifosfohidrolaza ácida representada en diversos hongos fitopatógenos como *Agrocybe pediades*, *Aspergillus japonicus* y *A. terreus* entre otros; enzima que hidroliza el ácido fítico que forma compuestos de inositol menores que se consideran moléculas señalizadoras.

4- La expresión diferencial de la enzima fitasa por RT-PCR sugiere su interferencia en el metabolismo del inositol fosfato que se encontró involucrado en el proceso de señalización en la interacción de *Ustilago maydis* con su huésped no natural *Arabidopsis thaliana*.

5- La enzima *myo*-inositol hexankifosfohidrolaza ácida (*Umf1*) puede participar en el proceso patogénico de *Ustilago maydis* al bloquear la respuesta de defensa de *Arabidopsis thaliana*.

## 9. PERSPECTIVAS

El estudio para determinar la función de estos nuevos genes localizados en *Ustilago maydis* que se expresan durante la interacción con la planta, podrán aportar información relevante sobre el proceso infectivo del hongo y trasplantar esta información a otros miembros del orden Ustilaginales.

Por otro lado estudios particulares sobre el gen *Umf1* permitirán revelar con certeza cuál es su función y si este juega un papel importante en el proceso patogénico de *U. maydis* en la planta.

El análisis del gen de la fitasa de *U. maydis* (*Umf1*) representa una nueva línea de investigación relacionada con la participación de los derivados del ácido fítico en la señalización de la planta en respuesta al patógeno, principalmente en *U. maydis*.

Cabe señalar que de este trabajo se derivará el análisis de los 35 genes diferenciales de *A. thaliana* que también fueron obtenidos en este trabajo y que no fueron analizados, ya que estos podrán ampliar la información relacionada con el proceso de respuesta de la planta y el desarrollo de la infección de *U. maydis*.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abromaitis S., and R. Stephens. (2009). Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLOS pathogens* (4):e1000357.
- Adam M., J.M Kelley, J. Gocayne, M. Dubnick, M. Polymeropoulos, H. Xiao, C. Merril, A. Wu, B. Olde, R. Moreno. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 252(5013):1651-1656.
- Adam D. (2000). *Arabidopsis thaliana* genome. Now for the hard ones. *Nature*. 408:792-793.
- Aime M., P. Matheny, D. Henk, E. Frieders, R. Nilsson, D. McLaughlin, L. Szabo y D. Hibbett. (2006). An overview of the higher-level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*. 98:869-905.
- Al-Shehbaz A. (1984). The tribes of *Cruciferae* (*Brassicaceae*) in the southeastern United States. *Journal Arnold Arbor*. 65:343–373.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *Molecular Biology*. 215:403-410.
- Altschul SF, T.L. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W Miller, D. J. Lipman. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein. Database search programs. 25(17):3389-402.
- Altschul, S.F. (1998). Fundamentals of database searching. *Trends Guide of Bioinformatics*. 16(1):7-9.
- Banuett F. (1991). Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 88: 3922-3926.
- Banuett F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics*, 8: 174–180.

- Banuett F and Herskowitz I. (1994). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a locus dependent and independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev.* 8:1367-1378.
- Banuett F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annue Review Genetics.* 29:179–208.
- Banuett F. (2002). Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. En: Osiewacz HD (Ed.) *Molecular biology of fungal development.* (pp. 349–398). New York, USA. Editorial Marcel Dekker.
- Bard M, N. D. Lees, T. Turi, D. Craft, L. Cofrin, R. Barbuch, C. Koegel, J. C. Loper (1993). Sterol synthesis and viability of *erg11* (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* 28(11);963-967.
- Basse, W. and G. Steinberg (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 5(2):83-92.
- Bauer, R., D. Begerow, F. Oberwinkler, M. Piepenbring, and M. L. Berbee. (2001). *Ustilaginomycetes*. En: McLaughlin, D. J., E. G. McLaughlin, and P. A. Lemke (Eds.) *The Mycota VII. Systematics and Evolution. Part B.* (pp. 57-84). Berlin. Editorial Springer-Verlag.
- Baxevanis A.D; B. Ouellette. (2001). Internet basics. *Current Protocols Protein Science.* Chapter 2:Unit 2.4.
- Begerow D, M. Stoll, and R. Bauer. (2006). A phylogenetic hypothesis of *Ustilaginomycotina* based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia.* 98:906–916.
- Bennett D.; J. Leitch, J. Price, S. Johnston. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25 % larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of 125 Mb. *Annue Botonaical.* 91:547-557.

- Bennetzen J. (2002). The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. *Science*. 296:60-63..
- Birnboim H. C., and J. Doly. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*.7(6):1513-1523.
- Bohn, L; A. S. Meyer, Rasmussen, S. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal Zhejiang University Science B*. 9(3):165-191.
- Bölker M. (2001). *Ustilago maydis*—A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147:1395-1401.
- Brachmann A, J. Schirawski, P. Müller, R. Kahmann. (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*. 22(9):2199-2208.
- Buckley, M. (2007). colloquium, The fungal kingdom diverse and essential roles in earth's ecosystem sponsored by the American Academy Of Microbiology, convened November 2-4, Tucson, Arizona.
- Burnett, J. (2003). Fungal populations and species. University Oxford press. USA. 368pp.
- Cavalier-Smith, T. (2006). Cell evolution and earth history: stasis and revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*. 361:969-1006.
- Christensen J. (1963). Corn Smut Caused by *Ustilago maydis*. The American Phytopathological Society. Monografía no. 2.
- Clontech Laboratories 2007.PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual, Inc. www.clontech.com Protocol No. PT1117-1 Version No. PR732188.
- Cramer R. and Lawrence C. B. (2003). Cloning of a gene encoding an Alt a 1 isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:2361-2364.
- Dayhoff M. O. (1978). Survey of new data and computer methods of analysis. En: Dayhoff M.O, (Ed.), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (pp.29), National Biomedical Research Foundation, Maryland. Editorial Silver Springs.

- Diatchenko, L.; Y-F Lau, A. Campbell, A. Chenchik, F. Moqa-Dam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Pukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, P. Siebert. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific ADNc probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 93:6025–6030.
- Díaz M. (2004). Estudio de la expresión de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de *Arabidopsis thaliana* y su función en la patogénesis. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Dieffenbach C., T.M. Lowe, G. Dveksler. (1995). General Concepts for PCR Oligonucleótido Design, En: Dieffenbach, C.W, and Dveksler, G.S. (Eds.) *PCR Oligonucleotides A Laboratory Manual* (pp 133-155) Cold Spring Harbor, New York, USA. Editorial Laboratory Press.
- Doehlemann G, K.van der Linde, D. Abmann, D. Schwammbach, A. Hof, M. Amitabh, D. Jackson, R. Kahmann. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathogens* 5(2):e1000290.
- Dürrenberger, F., K. Wong, and J. W. Kronstad. (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy Science USA*. 95:5684-5689.
- Durrenberger F., Kronstad J. (1999). The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics*. 261:281-289.
- Dürrenberger F, Laidlaw RD, Kronstad JW. (2001). The *hgl1* gene is required for dimorphism and teliospore formation in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*. 41(2):337-48.
- Galbraith E., D. Antonopoulos, B. White. (2004). Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environmental Microbiology*. 6(9):928-937.

- Garcerá-Teruel A., B. Xoconostle-Cázares, R. Rosas-Quijano, L. Ortiz, C. León-Ramírez, A. Specht Charles, R. Sentandreu, J. Ruiz-Herrera. (2004). Loss of virulence in *Ustilago maydis* by *Umchs6* gene disruption. *Research in microbiology*. 155(2):87-97.
- Gillissen, B., J. Bergemann, C. Sandmann, B. Schroeer, M. Bolker, and R. Kahmann. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* 68:647-657.
- Goff S. A., D. Ricke, T. H. Lan Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B. M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W. L. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T.C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R. M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant, S. Briggs. (2002), A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, 296(5565):92-100.
- Gola, S. and J. Pla. (2005). Metabolismo del D-arabinitol en el hongo patógeno *Candida albicans*: papel de la D-arabinitol deshidrogenasa Ard1p. *Memorias del XX congreso Nacional de Microbiología*. p.452.
- Gold, S. M., M. E. Brogdon, Mayorga and J. W. Kronstad. (1997). The *Ustilago maydis* Regulatory Subunit of a cAMP-Dependent Protein Kinase Is Required for Gall Formation in Maize. *The plant cell*, 9(9):1585-1594.
- Greiner R., C. Nils-Gunnar. (2006). myo-Inositol phosphate isomers generated by the action of a phytate-degrading enzyme of *Klebsiella terrigena* on phytate. *Canadian Journal of Microbiology* 52, (8):759-768.
- Hartmann H. A., R. Kahmann, M. Bölker. (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*. 15(7):1632-1641.
- Hassouni M., I. Ismaili-Alaoui, Gaime-Perraud, C. Agur and S. Roussos. (2006). Effect of culture media and fermentation parameters on phytase

production by the Thermophilic fungus *Myceliophora thermophila* in solid state fermentation. *Micologia aplicada internacional*. 18(2):29-36.

- Herrera, T. y M. Ulloa. (1998). *El Reino de los Hongos: Micología Básica y Aplicada*, Fondo de Cultura Económica, Segunda Edición, México, 552 pp.
- Hibbett, D. S. and R. G. Thom. (2001). Homobasidiomycetes. En: McLaughlin D. J., E. G. McLaughlin and P. A. Lemke. (Eds.) *The Mycota VII. Systematics and Evolution. Part B.* (pp. 121-170). Berlin. Springer-Verlag.
- Hibbett, D. (2006). A Phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia* 98: 917-925.
- Hibbett, D., M. J. Binder, M. Bischoff, P. F. Blackwell, O. E. Cannon, S. Eriksson, T. Huhndorf, P. James, M. R. Kirk, T. Lücking, F. Lumbsch, P. B. Lutzoni, D. J. Matheny, M. J. McLaughlin, S. Powell, C. L. Redhead, J. W. Schoch, J. A. Spatafora, R. Stalpers, M. C. Vilgalys, A. Aime, R. Aptroot, D. Bauer, G. L. Begerow, L. A. Benny, P. W. Castlebury, Y.-C. Crous, W. Dai, D. Gams, G. W. Geiser, C. Griffith, Gueidan, D. L.; G. Hawksworth, K. Hestmark, R. Hosaka, A. K. Humber, J. E. Hyde, U. Ironside, C. P. Kõljalg, K-H. Kurtzman, R. Larsson, J. Lichtwardt, J. Longcore, A. J. Miądlikowska, M. Miller, S. Moncalvo, F. Mozley-Standridge, E. Oberwinkler, V. Parmasto, J. D. Reeb, C. Rogers, L. Roux, J. P. Ryvarden, A. Sampaio, J. Schüßler, R. G. Sugiyama, L. Thorn, W. A. Tibell, C. Untereiner, Z. Walker, A. Wang, M. Weir, M. Weiß, M. White, K. Winka, Y. Yao, and N. Zhang. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111:509-547.
- Holliday R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair. Ams.*, 3:671-682.
- Hsien-Jung C., H. Wen-Chi, J. Kucapos, and L. Yaw-Huei. (2001). Salicylic acid mediates alternative signal transduction pathways for pathogenesis-related acidic  $\beta$ -1,3-glucanase (protein N) induction in tobacco cell suspension culture. *Journal of Plant Physiology*. 159(4):331-337.
- Innis, M.A., and D.H. Gelfand. (1994). Optimization of PCRs, En: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, (Ed.) *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications.* (pp 5-11). London. Editorial CRC Press.

- Ingold, C.T. (1991). An view of the active basidium in heterobasidiomycetes. *Mycology Res.* 95:618-621.
- Ji W., M. B. Wright, L. Cai, A. Flament, K. Lindpaintner. (2002). Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics.* 3(1):12.
- Kanehisa, M. and Bork, P. (2003). Bioinformatics in the post-sequence era. *Nature Genetics* 33:305-310.
- Kahmann R., J. Kämper. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytology*, 164:31-42.
- Kaneshiro E. (2002). Sterol biosynthesis in *Pneumocystis*: unique steps that define unique targets. *Drug Resistance Updates.* 5(6):259-268.
- Kamper J., R. Kahmann, M. Bolker, M. Li-Jun, T. Brefort, B. J. Saville, F. Banuett, J. W. Kronstad, S. E. Gold, O. Muller, M. H. Perlin, B. Wosten Han, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, C. G. Reynaga-Peña, K. Snetselaar, M. McCann, J. Pérez-Martín, M. Feldbrugge, W. Basse, G. Steinberg, I. Ibeas, W. Holloman, P. Guzman, M. Farman, E. Stajich, R. Sentandreu, M. González-Prieto, C. Kennell, L. Molina, J. Schirawski, A. Mendoza-Mendoza, D. Greilinger, K. Munch, N. Rossel, M. Scherer M. Vranes O. Ladendorf, V. Vincon, U. Fuchs, B. Sandrock, S. Meng, C. H. Ho, J. CahillBoyc, J. Klose, J. Klosterman, J. Deelstra, L. Ortiz-Castellanos, W. Li, P. Sanchez-Alonso, H. Schreier, I. Hauser-Hahn, M. Vaupel, E. Koopmann, G. Friedrich, H. Voss, T. Schluter, J. Margolis, D. Platt, C. Swimmer, A. Gnirke, F. Chen, V. Vysotskaia, G. Mannhaupt, U. Guldener, M. Munsterkotter, D. Haase, M. Oesterheld, H. Mewes, W. Mauceli, D. De Caprio, M. Wade, J. Butler, S. Young, B. Jaffe, S. Calvo, C. Nusbaum, Galagan and W. Birren. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Letters Nature.* 444:97-101.
- Kerovuo, J., J. Rouvinen, F. Hatzack. (2000). Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: Indication of a novel reaction mechanism. *Biochemical. Journal.* 352(3):623-628.
- Kirk, P.M., P.F. Cannon, J.C. David, and J. Stalpers. (2001). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi.* 9th ed. CAB International, Wallingford, UK.

- Klaus B., C. Lengeler, D'S Davidson, H. Toshiaki, S. Wei-Chiang, W. Ping, P. Xuewev, W. Michael, and H. Joseph. (2000). Signal transducción Cascades Reglating Fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:746-785.
- Leber R., S. Fuchsbichler, V. Klobucnikova, N. Schweighofer, E. Pitters K. Wohlfarter, M. Lederer, K. Landl, C. Ruckenstuhl, I. Hapala, F. Turnowsky. (2003). Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobials Agents Chemother* 47(12):3890-900.
- Lee N. and J. W. Kronstad. (2002). *ras2* Controls Morphogenesis, Pheromone Response, and Pathogenicity in the Fungal Pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*. 1(6):954-966.
- Lehmler C, G. Steinberg, K. M. Snetselaar, M. Schliwa, R. Kahmann and M. Böker. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO,journal* 16(12):3464-3473.
- Lei Xin G. and J. Porres. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25(21):1787-1794.
- León-Ramírez C; J. L Cabrera-Ponce, A. Martínez-Espinoza, L. Herrera-Estrella, L. Méndez-Morán, C. G. Reynaga-Peña, J. Ruiz-Herrera. (2004). Infection of alternative host plant species by *Ustilago maydis*. *New Phytologist*. 164:337-346.
- Liu J. Y., Y. C Song, Z. Zhang, L. Wang, Z. J. Guo, W. X. Zou, R. X. Tan. (2004). *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal Biotechnology*.114(3):279-87.
- Lupetti A., R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, S. Kelly. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Molecular Medicine* 8(2);76-81.
- Madden K and Snyder M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Anneu Review Microbiology*. 52:687-744.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj, and M. K. Bhat. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology Molecular and Biology Review*. 64:461-488.

- Matheny P. B., J. A. Gossmann, P. Zalar, Arun, T. K. Kumar, and D. S. Hibbett (2006). Resolving the phylogenetic position of the Wallemiomycetes: an enigmatic major lineage of Basidiomycota. *Canadian Journal of Botany* 84:1794-1805.
- Maugenest, S., I. Martinez, A. M. Lescure. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochemical Journal*, 322:511-517.
- Mayer, M.P. and B. Bukau. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Molecular Life Science*. 62:670-684.
- Meksem, K.; J. Shultz, F. Tebbji, A. Jamai, J. Henrich, H. Kranz, M. Arenz, T. Schlueter, H. Ishihara, N. Jyothi, B. Zhang, D. A. Lightfoot. (2005). A bacterial artificial chromosome based physical map of the *Ustilago maydis* genome. *Genome*, 48: 207–216.
- Méndez Morán L. (2004). Estudio de la infección experimental de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Avanzadas (CINEVSTAV) del Instituto Politécnico Nacional.
- Méndez-Morán L., C. G. Reynaga-Peña, P. S. Springer, J. Ruiz-Herrera. (2005). *Ustilago maydis* infection of the nonnatural host *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 95: 480-488.
- Meyerowitz E. M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review Genetics*. 21:93-111.
- Molina L. and R. Kahmann. (2007). An *Ustilago maydis* Gene Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxification Is Required for Virulence. *The Plant Cell* 19:2293-2309.
- Murashige T. y F. Skoog. (1969). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15:473-479.
- Murphy A., B. Otto, A. Brearley, P. Carr, and E. Hanke. (2008). A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *Plant Journal*. 56(4):638-652.
- Nampoothiri K., G. Tomes, K. Roopesh, G. Szakacs, V. Nagy, C. Socol, A. Pandey. (2004). Thermostable phytase production by *Thermoascus*

aurantiacus in submerged fermentation. Applied biochemistry and biotechnology. 118(1-3):205-14.

- Navarro, L., P Dunoyer, F. Jay, B. Arnold, N. Dharmasiri, M. Estelle, O. Voinnet, and J.D.G. Jones. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science 312:436–439.
- Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York (pp333).
- Oh. B. C. W.C. Choi, S. Park, Y. O. Kim, T. K. Oh. (2006). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and Histidene acid Phytases. Applied Microbiological Biotechnology 63: 362.372
- Palomino-Hermosillo Y. (2008). Obtención de un banco substractivo para el estudio molecular del proceso de patogénesis por *Aleternaria sp* en frutos de mango (*Manguifera indica*) c.v. Tommy atkins. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Tepic.
- Paltauf F., S. Kohlwein, S. A. Henry. (1992). Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. En: Paltauf F., S. Kohlwein, S. A. Henry. *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces*. (pp.415–500). Gene Expression Vol. 2. New York, USA. Editorial: CRC Press.
- Paniego N., R. Heinz, P. Fernandez, S. Lew, H. E. Hopp. (2004). Análisis informático de secuencias moleculares. En: Echenique V, C. Rubinstein y L. Mroginski (Eds.), *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*, (pp 239-254) Argentina. Editorial de INTA.
- Pearson, W. (1998). Empirical statistical estimates for sequence similarity searches. Journal molecular Biology 276(1):71-84.
- Pessino, S., C. Martelotto; G Luciano. (2004). Métodos para el estudio de la expresión de genes. En: Echenique V; C. Rubisntein; L. Mroginski; (Eds.), *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal* (pp. 229-238). Argentina: Editorial INTA.
- Pinzón M. (2007). Guía Bioinformática .Centro de Bioinformática del Instituto de Bioteconología en la Universidad Nacional de Colombia y del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes.

- Pradel E. and J.J Ewbank. (2004). Genetic models in pathogenesis. *Annual Reviews in Genetics* 33:347-363.
- Raboy V. (2007). The ABCs of low-phytate crops. *Nature biotechnology*. 25(8):874-875.
- Ramachandran S., K. Roopesh, M. K. Nampoothiri, G. Szakacs, A. Pandey, (2005). Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus spp.* using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry*, 40(5), 1749-1754.
- Ramos M. A., R. Sánchez-López, R. Mares, F. Olvera and A. Alagón. (2005). Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that functionally complements the *dsbA* mutation in *Escherichia coli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 143 (2):236-240.
- Reinhardt, A. and T. Hubbard. (1998). Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Research*. 26(9):2230--2236.
- Roopesh K., S. Ramachandran, K. Nampoothiri, G. Szakacs, A. Pandey. (2006), Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource technology*. 97(3):506-511.
- Ruiz-Herrera, J. and A.D. Martínez-Espinoza. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology* 1: 149–158.
- Ruiz-Herrera J., C. Leon-Ramirez, D. Martinez-Espinoza. (2000). Morphogenesis and pathogenesis in *Ustilago maydis*. *Recent Research Developments in Microbiology*. 4: 585–598.
- Santoro M. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical pharmacology*. 59(1):55–63.
- Sambrook J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Schneider, D.S. and M. Shahabuddin. (2000). Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science*, 288:2376-2379.

- Serrano-Cartagena J. (1998). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del Arabidopsis Information Service. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante.
- Seviere, C. S. and C. A. Kaiser. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 3:836–847.
- Sharrocks A. D. (1994). The design of oligonucleótidos for PCR. En: H. G. Griffin and A. M. Griffin (Eds.) *PCR Technology, Current Innovations*. (pp 5-11). London. Editorial CRC Press.
- Shears S.B. (2004). How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochemistry urnal*. 377:265–280.
- Snetselaar, K. M. y Mims, C. W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* 83:843-850.
- Strasburger, E. (1994). *Tratado de Botánica*. 8a. Ed. castellana. Ed. Omega. Barcelona. (p.56).
- Swann E. C. and J. W Taylor. (1993). Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85:923-936.
- Swann E. C., E. M. Frieders, and D.J. McLaughlin. (2001). Urediniomycetes. En: McLaughlin, D. J., E. G. McLaughlin, and P. A. Lemke, (Eds.). *The Mycota VII. Systematics and Evolution. Part B*. (pp. 37-569). Berlin. Editorial Springer-Verlag.
- Van Etten R. L., R. Davidson, P. E. Stevis, H. MacArthur, D. L. Moore. (1991). Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(4):2313-2319.
- Weber I., C. Gruber, and G. Steinberg. (2003). A class V myosin required for mating, hyphal growth and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. 15:2826-2842.
- Wells K., and R. J. Bandoni. (2001). Heterobasidiomycetes.. En: McLaughlin, D. J., E. G. McLaughlin, and P. A. Lemke, (Eds.) *The Mycota VII. Systematics and Evolution. Part B*. (pp. 85-120). Berlin. Editorial Springer-Verlag.

- Wilkinson, B., and H. F. Gilbert. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochemistry Biophysiscs Acta* 1699:35-44.
- Wilson C. and M. Wisniewski. (1989). Biological control of postharvest disease of fruits anda vegetables: An emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 425-441.
- Yang, X., B.E. Scheffler, and L.A. Weston. (2006). Recent developments in primer design for DNA polymorphism and mRNA profiling in higher plants. *Plant Methods* 2(1):4.
- Yee A. R. and J. W. Kronstad. (1993). Construction of chimeric alleles with altered specificity at the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Protocols National Academy of Science*. 90(2):664–668.
- Yu, J.K., J. Mangor, L. Thompson, K.J. Edwards, M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. (2002). Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. *Genome* 45:652–660.
- Yuryev A. (2007). PCR design using statiscal modelling. En: Yuryev A. (Ed.), *PCR primer design Methods in Molecular Biology* 402:93-103 Totowa, NJ. Editorial Human Press.
- Zdobnov, E.M., von Mering, I. Letunic, D. Torrents, M. Suyama, R.R. Copley, G.K. Christophides, D. Thomasova, R.A. Holt, G.M. Subramanian. (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* 298:149–159.

### **Bases de datos genómicas y sitios web visitados**

- Broad Institute’s Fungal Genome Initiative (FGI). (2004). Candidate Genome website, <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/candidates.html>
- Mewes H. W., K. Albermann, K. Heumann, S. Liebl, and F. Pfeiffer. (1997). MIPS-a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Research* 25:28-30, <http://mips.helmholtz-muenchen.de>

- Ridgway P, C. Maison, G. Almouzni. (2002). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology Cromatina Sitio Web (consultado 23 de febrero del 2009).  
<http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/CromatinaSpID30017SS.html>
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plan *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796-815.  
[http://www.genomenewsnetwork.org/articles/04\\_00/what\\_makes\\_chart.shtm](http://www.genomenewsnetwork.org/articles/04_00/what_makes_chart.shtm)
- The C. elegans Sequencing Consortium. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C.elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282(5396):2012-2018. [http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/)
- The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (1960). <http://www.iupac.org/>. (consultado:15 de Enero del 2009).
- USDA, The PLANTS Database (2008). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. <http://plants.usda.gov>

BIBLIOTECA CUOSA