

Búsqueda de reguladores de silenciamiento de grupos de genes en el genoma de *Ustilago maydis*

Sigrid L. Farfán, Blanca N. Ruíz, Ramón R. Barrales.

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo. Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía, Sevilla, España.



INTRODUCCIÓN

Ustilago maydis es un hongo patógeno que infecta a la planta del maíz causándole tumores y problemas en el crecimiento, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas cada año (1). Se ha demostrado experimentalmente que *U. maydis* infecta a través de efectores, un gran conjunto de factores de virulencia fúngica secretados, procedentes de la expresión de genes que se organizan en grupos de genes o *clusters*, en regiones del genoma (2). Se sabe que el principal mecanismo por el que las células eucariotas regulan la expresión de grandes regiones cromosómicas es a través de la modificación de histonas, que resulta en la formación de un tipo de cromatina transcripcionalmente inactiva, denominada heterocromatina. Además, se conoce que el control de las interacciones huésped-patógeno está relacionado con las modificaciones de la cromatina. En definitiva, los eucariotas superiores deben modificar sus patrones de expresión génica para adaptarse a las nuevas circunstancias ambientales, siendo este control de la expresión génica un proceso complejo que implica una acción coordinada de múltiples elementos reguladores (3). En *U. maydis*, concretamente, la expresión de genes se encuentra regulada mediante factores de transcripción, inhibidores, etc.; sin embargo, se desconoce cómo se regulan los *clusters* relacionados con genes de infección y cómo se correlacionan los cambios en la cromatina y en la morfología secuencial (2). Por todo ello, el objetivo de nuestro estudio es buscar, en *U. maydis*, reguladores que controlen el silenciamiento de grandes regiones de su genoma o de heterocromatina, mediante diferentes técnicas de mutagénesis.

RESULTADOS

Estrategia para mutagénesis

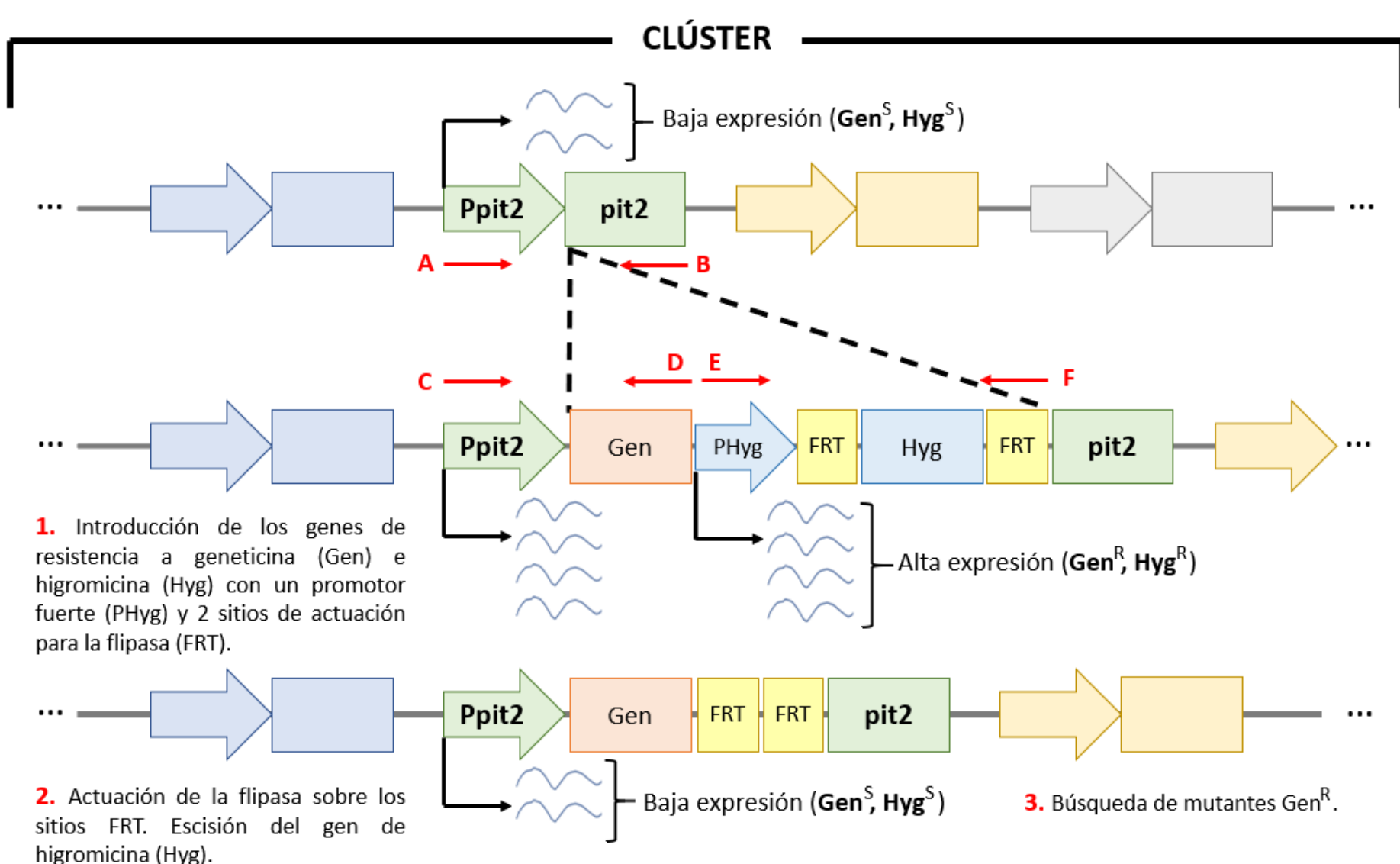


Figura 1. La introducción de un promotor fuerte como el de la Resistencia a higromicina (PHyg) provoca la alteración de la expresión del *cluster*, transcribiéndose los genes de resistencia introducidos (geneticina, Gen, e higromicina, Hyg) y variando, así, la resistencia de *U. maydis* a diferentes antibióticos (1). Por su parte, la flipasa actúa sobre los sitios FRT, escindiendo ese promotor fuerte, alterando de nuevo la expresión y las resistencias (2). Se realiza la misma estrategia para el *cluster* de *tin2*. Las flechas rojas corresponden a los oligos usados en las PCRs que se muestran en la Figura 2.

Construcciones génicas, demostración genotípica

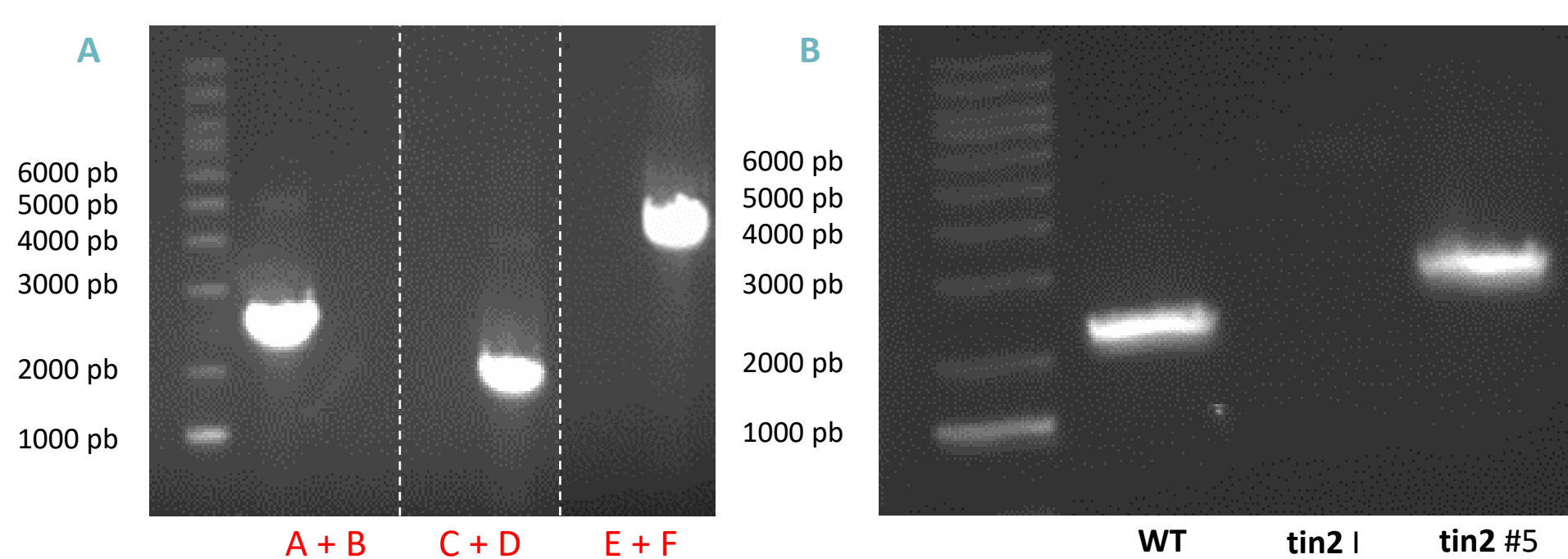


Figura 2. A. El tamaño total del *cluster* de *pit2* en el WT de *U. maydis* es de 2076 pb (pocillo izquierdo de cada subzona) y en el del mutante Ppit2:Gen:Hyg:pit2 (Gen #1) es de 5916 pb (pocillo derecho de cada subzona), no visible en el gel (oligos A + B). Las bandas correspondientes a los fragmentos del promotor de *pit2* + gen de resistencia a geneticina (oligos C + D) y del gen de resistencia a higromicina + sitios FRT + gen *pit2* (oligos E + F) solo aparecen en el mutante Gen #1. **B.** El tamaño total del *cluster* de *tin2* en el WT de *U. maydis* es de 2060 pb y en el mutante Ptin2:Nat:Hyg:tin2 (*tin2* I) es de 5451 pb, no visible en el gel. El mutante *tin2* #5 (Ptin2:Nat:tin2) tiene un tamaño de 2653 pb y corresponde al mutante *tin2* I transformado con flipasa, es decir, sin el gen de resistencia a higromicina.

Construcciones génicas, demostración fenotípica

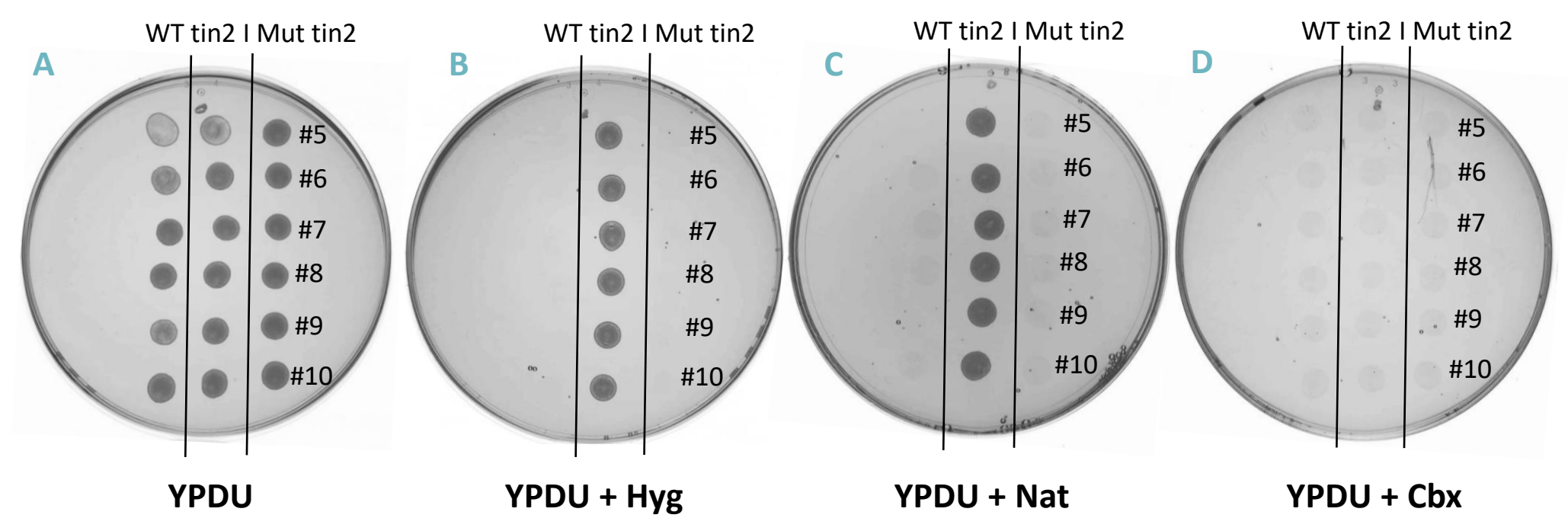


Figura 3. A. Placa de YPDU, medio rico. Crecen todos los candidatos de *U. maydis*, tanto el WT como el mutante *tin2* I, como los posibles candidatos positivos (Mut *tin2*: #5, #6, #7, #8, #9 y #10) transformados con flipasa. **B.** Placa de YPDU + Hyg. Crece el mutante *tin2* I, que posee el gen de resistencia a higromicina. **C.** Placa de YPDU + Nat. Crece el mutante *tin2* I, que cuenta con el gen de resistencia a Nat. **D.** Placa de YPDU + Carboxina (Cbx). No crece ningún candidato, ya que no presentan gen de resistencia a Nat.

Búsqueda de dosis subletal mediante aplicación de radiación UV

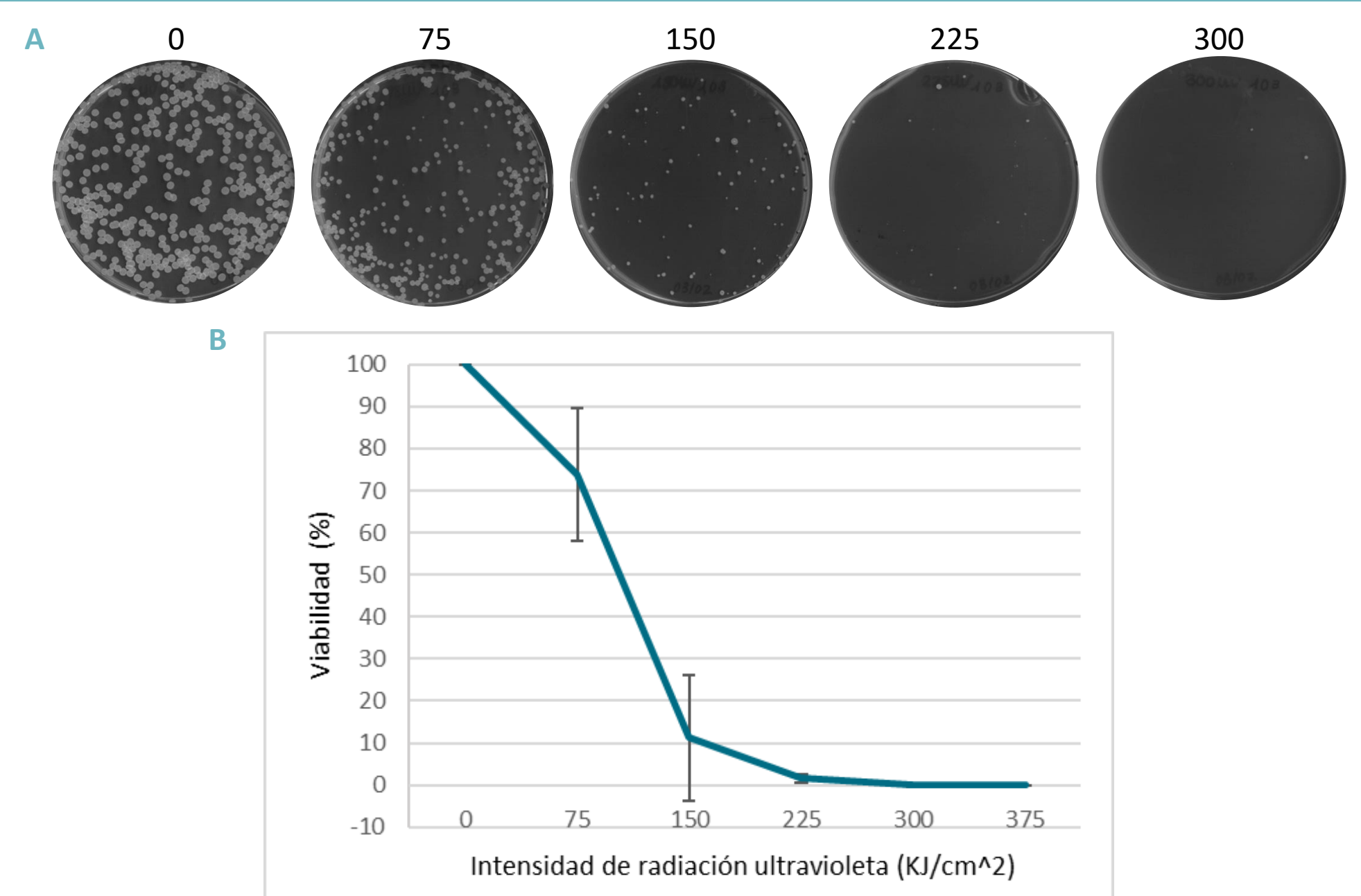


Figura 4. A. Se aplican dosis crecientes de radiación ultravioleta: 0, 75, 150, 225, 300 y 375 KJ/cm². Se realiza conteo de colonias y se observa la disminución en número y tamaño de las mismas. **B.** Se estudia la viabilidad celular después de aplicar radiación ultravioleta para encontrar la dosis subletal en el WT y, posteriormente, compararla en el mutante *tin2* Inicial (*tin2* I) y buscar mutantes espontáneos que puedan aparecer.

CONCLUSIONES

Hemos conseguido una cepa donde hemos integrado los genes de resistencia a geneticina e higromicina (Gen e Hyg), Gen #1 (Ppit2:Gen:Hyg:pit2); otra cepa donde hemos integrado los genes de resistencia a Nat y a higromicina, *tin2* I (Ptin2:Nat:Hyg:tin2), además de otra cepa, partiendo de esta última, a la que se le ha extraído el gen de resistencia a higromicina (Ptin2:Nat:tin2). Todas estas cepas, anteriormente, eran sensibles a todos estos antibióticos (geneticina, higromicina y nat).

Por último, se está poniendo a punto el uso de mutagénesis mediante radiación ultravioleta para conseguir, más adelante, nuevos mutantes.

REFERENCIAS

- (1) Jörg Kämper *et al.* (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 444, 97-101.
- (2) Kellner, R., Hanschke, C., & Begerow, D. (2014). Patterns of variation at *Ustilago maydis* virulence clusters 2A and 19A largely reflect the demographic history of its populations. *PLoS one*, 9(6), e98837.
- (3) Elías-Villalobos, A., Barrales, R. R., & Ibeas, J. I. (2019). Chromatin modification factors in plant pathogenic fungi: insights from *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 129, 52-64.