ISBN: 978-607-00-2083-4

Estudio de genes diferenciales durante el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* un huésped no natural

Méndez-Morán Lucila[1] y Ruiz-Herrera José[2]

[1]Depto de Ecología, C.U.C.B.A. Universidad de Guadalajara Apdo. Postal 39-82. Zapopan, Jal., 45101, México. [2]Depto de Ing. Genética de plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Campus Guanajuato, Irapuato, Gto. Apdo. Postal 629.
Correo-e: lmendez@cucba.udg.mx

Ustilago maydis como modelo de estudio

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto patógeno que en la naturaleza infecta dos plantas, maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*), el probable progenitor del maíz, siendo el agente etiológico de la enfermedad llamada carbón común o "huitlacoche" (nombre Náhuatl por el cuál se conoce en México). *U. maydis* se ha establecido como un organismo modelo en el estudio de las interacciones planta-microorganismo. Este hongo no presenta una estrategia de virulencia agresiva para matar a su huésped, y se encuentra entre el grupo de los parásitos biotrofos que dependen del tejido vivo para su proliferación y desarrollo. *U. maydis* requiere el paso a través de la planta huésped para culminar con su ciclo de vida.

La fase infecciosa del hongo requiere de la fusión de dos células levaduriformes haploides de sexos complementarios, proceso que es regulado por la interacción de dos *loci* de apareamiento: *a* y *b*, llevando a cabo la formación de la forma micelial dicariótica, que requiere de la planta para su crecimiento. El desarrollo de la enfermedad está caracterizado por la presencia de clorosis (amarillamiento del tejido), aumento en la producción de antocianinas (pigmentos de color violeta), disminución del crecimiento de la planta, y especialmente la formación de tumores, que son estructuras únicas en donde se forman las teliosporas que corresponden al estadio diploide transitorio (sin vida vegetativa) del hongo (Banuett, 1991; 1992; 1995; Banuett y Herskowitz, 1994; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998) (Figura 1).

A B

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (sin comprimir).

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (sin comprimir).

Figura 1. Carbón común o "Huitlacoche" (A) y representación de los *loci* de apareamiento de *Ustilago maydis* (Bolker, 2001).

Se ha propuesto que durante el proceso de infección, pueden estar participando señales del medio ambiente y del huésped, las cuales son percibidas y transmitidas por diferentes vías de transducción de señales, principalmente las vías MAPK y PKA (Lengeler y cols., 2000), habiéndose descrito un probable entrecruzamiento entre ambas (Gold y cols., 1994). La interacción de estas dos vías regulatorias puede ocurrir a diferentes niveles, y su entrecruzamiento puede determinar el desarrollo del ciclo sexual de *U. maydis*, su desarrollo filamentoso (micelio) y la virulencia (Bölker, 2001). Sin embargo, no se conoce con detalle los procesos que determinan cada uno de éstos fenómenos de forma individual.

U. maydis se considera un modelo fúngico importante que ha sido ampliamente utilizado en estudios biológicos y genéticos (Bölker, 2001) y se ha determinado como un hongo de gran importancia para el estudio del desarrollo dimórfico y la interacción planta-patógeno. Las características que hacen a este organismo genéticamente atractivo son; (*a*) la existencia de una fase haploide, en la cual el hongo forma colonias compactas, que permiten el uso de técnicas microbiológicas comunes; (*b*) la posibilidad de construir diploides en el laboratorio, que hace posible el llevar a cabo exámenes de dominancia y complementación; (*c*) la disponibilidad de técnicas de transformación con ADN exógeno; (*d*) su susceptibilidad a que un segmento genómico sea remplazado con una copia mutada del gen por recombinación homóloga; (*e*) la existencia de varios marcadores de selección para la manipulación genética: (*f*) la existencia de meiosis, lo cual facilita llevar a cabo análisis de segregación; (*g*) la capacidad para completar su ciclo de vida en plantas jóvenes de tres semanas de edad o menos; (*h*) la posibilidad de analizar la transición dimórfica por medio de la manipulación del pH externo; (*i*) contar con un sistema en el cual se pueda completar el desarrollo del ciclo de vida del hongo *in vitro* (Ruiz-Herrera y cols., 1999); y muy particularmente, el hecho de que su genomio sea totalmente conocido (dirección MIPS sobre secuencia del genomio de *U. maydis*; Nature y cols., 2006; http: //www. broad. mit. Edu/ annotation/ fungi/ ustilagomaydis/).

El patosistema *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana*

Se tienen evidencias de que *U. maydis* es capaz de infectar otros huéspedes alternativos tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (León-Ramírez y cols., 2004) y en especial *A. thaliana* (Reynaga-Peña y cols., 2001). Recientemente hemos establecido el uso del patosistema *U. maydis-A. thaliana*, el cual constituye un modelo experimental muy útil para abordar y entender diversos fenómenos relacionados con el proceso patogénico del hongo.

El uso del patosistema *U. maydis-A. thaliana* se considera útil en el estudio de la interacción planta-patógeno, como ha sucedido en otros patosistemas establecidos con esta planta, tomando en consideración todas las ventajas de ella, ya que *A. thaliana* es un modelo muy adecuado para facilitar la búsqueda de mutantes recesivas de *U. maydis* afectadas en patogenicidad.

En *A. thaliana* contrariamente a lo que ocurre en el maíz, las formas haploides del hongo son virulentas (Mendez-Moran, 2004; Mendez-Moran y cols., 2005) (Figura 2).

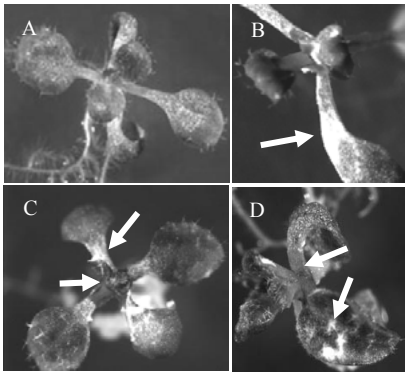

Figura 2. Patosistema Arabidopsis thaliana-ustilago maydis. *A. thaliana* sin inocular (A). Aspecto del crecimiento micelial de *U. maydis* sobre una planta de *A. thalian* inoculada con la mezcla de cepas haploides sexualmente compatibles de *U. maydis* (B). Presencia de zonas necróticas y crecimiento de micelio en plantas de *A. thaliana* inoculada con una cepa haploide de *U. maydis* (C y D) (Mendez-Moran, 2004; Mendez-Moran y cols., 2005).

Las ventajas del uso de *A. thaliana* como planta modelo son la fácil manipulación de un gran número de plantas debido a su tamaño pequeño; un tiempo de generación corto, contar con los mapas físico y genético de *A. thaliana* (Meinke y cols., 1998), y el conocimiento en su totalidad de la secuencia de su genomio (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), lo que a futuro facilitará la identificación de genes de la planta regulados diferencialmente durante la infección. Por último, una característica adicional del sistema es la disponibilidad de líneas derivadas de *A. thaliana* por mutagénesis insercional ("enhancer/gene trap") (Springe y cols., 1995; Sundaresan y cols., 1995), que son utilizadas para la identificación de genes que se activan bajo diferentes condiciones. Este sistema permite detectar la activación de genes, basándose en los patrones de expresión de un gen reportero que ha sido integrado al azar en el genomio de *Arabidopsis* (Sundaresan y cols., 1995).

Uso del patosistema *Arabidopsis thaliana-Ustilago maydis* en el estudio de genes de patogenicidad

A. thaliana tiene la ventaja de que se pueden analizar mutantes no virulentas de *U. maydis* en gran escala y la posibilidad de reducir el tiempo de manejo bajo condiciones axénicas (Mendez-Moran y cols., 2005). Otros huéspedes alternativos previamente empleados en la infección con *U. maydis,* requieren de tiempos largos, lo que complica el mantenimiento de las condiciones axénicas (León-Ramírez y cols., 2004). Además de estas ventajas, se sabe que *A. thaliana* ha sido utilizada como modelo adicional a los de animales, para comprender el mecanismo de virulencia y elucidar las bases moleculares de patogénesis de *P. aeruginosa* (Rahme y cols., 2000), y de algunos otros hongos como *Verticillium longisporum* y *V. dahliae* (Steventon y cols., 2001).

La secuenciación del genoma de *A. thaliana*, ha generado ya interesantes datos cuantitativos y de organización sobre genes que cumplen todo tipo de funciones. Por ejemplo, el análisis de 1.9 millones de pares de bases (Mb) sugiere que aproximadamente un 14% de los genes de *A. thaliana* pueden participar en resistencia a enfermedades a diferentes niveles, incluyendo componentes de

cascadas de señalización y proteínas con actividad antimicrobiana. De la misma manera, el análisis de 67 Mb (más del 50% del genoma de Arabidopsis) ha permitido calcular que existen aproximadamente 200 genes potenciales de resistencia, con 120 de ellos ya detectados.

Mediante el uso del potosistema *A. thaliana-U. maydis* se han analizado genes involucrados en el proceso patogénico mediante el uso de bancos substractivos (Méndez-Morán, 2004; Méndez-Morán y cols., 2005; Reynaga-Peña y cols., 2006). Por otro lado el uso de técnicas de expresión diferencial como son hibridación substractiva y análisis por microarreglos, se pueden identificar genes que son sobre-expresados o cuya expresión sea inhibida tanto en el hongo como en la planta durante la infección, como son aquellos genes relacionados directamente con el proceso patogénico, o genes implicados en la resistencia de la planta a la infección o en respuesta al hongo. El uso de un sistema modelo se ha propuesto sobre la base de que los estudios con maíz, el huésped natural de *U. maydis*, son sumamente complicados, dado que el genoma del maíz aún se desconoce en su totalidad en contraste con el genoma de *A. thaliana* el cual esta completamente secuenciado, otro punto importante es el hecho de que varios de los fenómenos involucrados en el proceso patógenico no pueden ser separado, lo cual si ha sido posible en *A. thaliana,* y además, contrariamente a lo que ocurre con el maíz, la forma haploide de *U. maydis* es patogénico en *A. thaliana* facilitando su análisis (Mendez-Moran y cols., 2005).

La infección de *U. maydis* en *A. thaliana* se caracteriza por la formación de micelio en las hojas de la planta en las primeras horas de la infección (18h), cabe señalar que se presentan síntomas característicos de la infección en el maíz como son: formación incrementada de antocianinas, desarrollo de clorosis en las hojas y la aparición de malformaciones en la planta (Méndez-Morán, 2004; Mendez-Moran y cols., 2005) (Figura 2 y Figura 3).

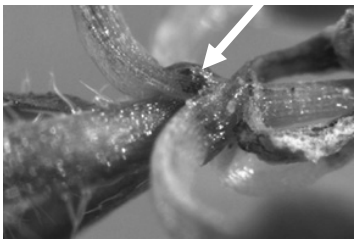

Figura 3. Desarrollo de malformaciones que muestra uno de los síntomas en plantas de *A. thaliana* a tiempos tardíos después de la inoculación, en respuesta a la infección por *U. maydis* (Méndez-Morán, 2004;Mendez-Morán y cols., 2005).

Con el fin de analizar qué genes son regulados positivamente durante la infección de *A. thaliana* por *U. maydis* como se ha mencionado, se han utilizaron dos técnicas: la construcción de bibliotecas substractivas de ADNc y análisis por microarreglos, a partir de ARN de plantas infectadas a tiempos tempranos y tardíos después de la inoculación.

Los resultados obtenidos hasta el momento abren un amplio panorama para el estudio los genes diferenciales de *U. maydis*. Hasta el momento se han identificado varios genes de *U. maydis* y *A. thaliana* mediante bancos substractivos, así como por microarreglos en el caso de *A. thaliana*.

Mediante el uso de la técnica de hibridación substractiva a diferentes tiempos (Alemán-Duarte y cols., 2008; Méndez-Morán y cols., 2006; Méndez-Morán y cols., 2008), se han identificado genes correspondientes a *U. maydis*: el

gen que codifica una alcohol deshidrogenada homóloga a la expresada en *Cladosporiium fulvum* durante su crecimiento en plantas de tomate (Coleman y cols., 1997; Segers y cols., 2001), un gen homólogo a la O-acetilhomoserina sulfohidrolasa (Kamper y cols., 2006), y el gen que codifica la proteína kinesina (Kin3: 9455 nt) relacionado con el crecimiento de las hifas (Wedlich-Söldner y cols., 2002; Schuchardt y cols., 2005). Por otra parte, para *Arabidopsis* se han identificaron genes sobre-expresados que codifican: un inhibidor de serina-proteasas que se sabe que actúa en la respuesta a patógenos en plantas (Ryan, 1990; Pearce y cols., 1991), el gen que codifica la PbsA que es un precursor de la proteína D1 del centro de reacción del fotosistema II en cloroplastos (Liere *et al.*, 1995) y el gen que codifica la proteína CP12 presente en el cloroplasto y que se sobreexpresa en respuesta a estrés metabólico (Wedel y cols., 1997; Wedel y Soll, 1998) entre otros. Mediante el uso de microarreglos se ha iniciado empleando ARNs obtenidos a partir de plantas infectadas por diferentes tiempos, y como controles a las plantas sanas, y cultivos de *U. maydis*, mediante este análisis se han identificado 700 genes de *A. thaliana,* entre los cuales se han identificado genes de respuesta de defensa, así como genes de respuesta a hongos, actualmente se esta llevando a cabo el análisis de dichos genes (Méndez-Morán y cols., 2008).

Se esta trabajando con el análisis de los genes identificados en forma mas exhaustiva, teniendo como meta el obtener y caracterizar en forma completa los genes identificados de *A. thaliana* y *U. maydis* que se sobre expresan o se reprimen durante la interacción patogénica, así como el obtener mutantes en dichos genes para estudiar su fenotipo y su implicación directa en el proceso patogénico tanto en plantas de *A. thaliana* como en maíz el huésped natural del hongo. Mediante este trabajo se amplían las expectativas sobre la importancia de este modelo en el estudio de los fenómenos implicados en el proceso patogénico de este hongo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo otorgado por, PROMEP, CONACYT, CONCYTEG y la Universidad de Guadalajara para la realización y continuación de este trabajo de investigación.

LITERATURA CITADA

Alemán-Duarte M.I., Méndez-Morán L., Ruiz-Herrera J. 2008. Construction of 72h substractive cDNA library using *the Ustilago maydis-Arabhidopsis thaliana* pathosystem. Memorias del 4th Internacional Ustilago Meeting, Rauischholzhausen castle, Alemania.

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. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual Review of Genetic,*. 29: 179-208.

Banuett F., Herskowitz I. 1994. Identification of Fuz 7, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and independent steps in the fungal life cycle. *Genes and Development*, 8: 1367-1378.

Bölker M. 2001. *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147: 1395-1401.

Coleman M., Henricot, B., Arnau, J., and Oliver, R. P. 1997. Starvation-induced genes of the tomato pathogen Cladosporium fulvum are also induced during growth in planta. *Mol Plant Microbe Interact*, 10: 1106-1109.

Gold S., Duncan G., Barret K., Kronstad J.W. 1994. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes and Development*, 8: 2805-2816.

Kamper J., Kahmann R., Bolker M., Ma LJ., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Muller O., Perlin M.H., Wosten H.A.B., de Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Pena C.G., Snetselaar K., McCann M., Perez-Martin J., Feldbrugge M., Basse C.W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature,* 444(7115): 97-101.

Lengeler K.B., Davidson R.C., D´Souza C., Harashima T., Shen W., Wang p., Pan X., Waugh M., Heitman J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Revie,*. 64:746-785.

León-Ramírez C., Cabrera-Ponce J.L., Martínez-Espinoza A.D., Herrera-Estrella L., Méndez-Morán L., Reynaga-Peña C.G., Ruiz-Herrera J. 2004. Infection of alternative host plant species by *Ustilago maydis*. *New Phytologyst*, 164: 337-346.

Liere K., Kestermann M., Müller U., Link G. 1995. Identification and characterization of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast DNA region containing the genes psbA, trnH and rps19′. *Curr Genet,* 28(2): 128-130.

Mainke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koorneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Scienc,* 282: 662-682.

Méndez-Morán L. 2004. Estudio de la infección experimental de *Arabidopsis thaliana* por *Ustilago maydis*. Tesis de Doctorado; Biotecnología de plantas, Departamento de Ingeniería genética de plantas, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

Mendez-Moran L., Reynaga-Peña C.G., Springer P.S., J. Ruiz-Herrera. 2005. *Ustilago maydis* infection of the nonnatural host *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology,* 95(5): 480-488.

Méndez-Morán L., Villanueva-Viramontes S., Ruiz-Herrera J. 2006. Análisis de genes regulados positivamente en el patosistema. experimental *Ustilago maydis – Arabidopsis thaliana*. Memorias del XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guanajuato, Gto.

Méndez-Morán L., Ibarra-Laclette E., Ruiz-Herrera J. 2008. Identification of genes regulated in the *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana* pathosystem. Memorias del 4th Internacional Ustilago Meeting, Rauischholzhausen castle, Alemania.

Pearce G., Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science,* 253: 895–898.

Rahme L.G., Ausubel F.M., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B.C., Lau G.W., Mahaja-Miklos S., Plotnikova J., Tan M., Tsongalis J., Walendziewicz C.L., Tompkins R.G. 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 8815-8821.

Reynaga-Peña C.G. Ruiz-Herrera J., Springer S.P. 2001. Infection of Arabidopsis thaliana by *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics Newsletter*, XXI Fungal Genetics Conference, 48: 113.

Reynaga-Peña C.G., Mendez-Moran L., Jablonska B., Springer P.S., León-Ramírez C., Ruiz-Herrera J. 2006. The *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana* pathosystem as a model for fungal-plant interactions. *Biology of Plant Microbe Interaction,* 5: 606-610.

Ryan C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 425-449.

Ruíz Herrera J., Martínez-Espinoza A.D. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*, 1: 149-158.

Ruiz-Herrera J., León-Ramírez C., Cabrera-Ponce J.L., Martínez-Espinoza A.D., Herrera-Estrella L. 1999. Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis* in vitro. *Molecular & General Genetics*, 262(3): 468-72.

Schuchardt I., Aßmann D., Thines E., Schuberth C., Steinberg G. 2005. Myosin-V, kinesin-1, and kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cel,*. 16(11): 5191-5201.

Segers G., Bradshaw N., Archer D., Blissett K., Oliver R.P. 2001. Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. *Mol Plant Microbe Interact*, 14: 367-377.

Springer P.S., McCombie W.R., Sundaresan V., Martienssen R.A. 1995. Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in *Arabidopsis*. *Science*, 268: 877-880.

Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J.D.G., Dean C., Ma H., Martienssen R.A. 1995. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*, 9: 1797-1810.

Steventon L.A., Okori P., Dikelius C. 2001. An investigation of the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to isolates of two species of *Verticillium*. *Journal of Phytopathology (phytopathologische zeitschrift),* 149: 395-401.

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408: 796-815.

Wedel N., Soll J., Paap B.K. 1997. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10479-10484.

Wedel N., Soll J. 1998. Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9699-9704.

Wedlich-Söldner R., Straube A., Friedrich M.W., Steinberg G. 2002. A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal*, 21: 2946–2957, doi: 10.1093/emboj/cdf296