



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Ultraestructura del nucléolo de dos hongos
basidiomicetos: *Ustilago maydis* y *Pleurotus* sp.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR SAID QUIROZ ZERECERO

TUTOR DE TESIS:

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Nada es demasiado maravilloso para ser verdad si es consistente con las leyes de la naturaleza” Michael Faraday.

“En la investigación básica, los científicos son libres de colmar su curiosidad e interrogar a la naturaleza no con un fin práctico, sino en busca del conocimiento por sí mismo” Carl Sagan.

“Esto se hizo para mi, entre todas las maravillas que he descubierto en la naturaleza, la más maravillosa de todas, y debo decir por mi parte, que no había visto antes nada más agradable que estas miles de criaturas vivas en una gota de agua, moviéndose entre unos y otros, cada una de ellas teniendo su propio movimiento” Leeuwenhoek.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, Profesor de Carrera Titular C, Departamento de Biología Celular.

A la Dra. María de Lourdes Segura Valdez, Profesora de Carrera Titular B, Departamento de Biología Celular.

A la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno, Profesora de Carrera Asociado C.

A la Dra. Reyna Lara Martínez, Técnica Académica Asociado C, Departamento de Biología Celular.

Al Dr. Jose Ruiz Herrera del CINVESTAV Irapuato, por brindarme una cepa de *Ustilago maydis*.

Al Dr. Sigfrido Sierra Galván Profesor de Carrera Titular A, Departamento de Biología Comparada, por brindarme una cepa de *Pleurotus* sp.

Al programa (DGPA-PAPIME PE213916).

Mis sinceros agradecimientos a los revisores de este trabajo:

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dr. Sigfrido Sierra Galván

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Dr. Gabriel López Velázquez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dedico esta tesis a mi abuela Leonila Balderas quien siempre fue una persona ejemplar, con quien compartí 22 años y que es parte fundamental en mi formación.

Agradezco a mi madre Angelica Zerecero por siempre ser un ejemplo a seguir en todos los sentidos, por enfrentar conmigo cualquier situación y por siempre confiar en mi. Principalmente, por todo el tiempo y amor dedicados.

Agradezco a mi padre Oscar Quiroz por siempre motivarme y ayudarme a ser mejor, por su comprensión, por brindarme siempre lo mejor y por los momentos inolvidables que he tenido a su lado.

Agradezco a mi hermano Carlos Quiroz por apoyarme a lo largo de mi vida, por ser mi amigo y por estar conmigo en situaciones difíciles.

Agradezco a Karina Díaz por su apoyo ante cualquier situación, por motivarme a ser mejor cada día y por ayudarme a cumplir mis sueños.

A mis amigos de siempre Alejandro Barrios, Alfredo Tress, Jose Luis Jiménez y Luis Cortes por su sincera amistad.

A mis amigos Moises Enriquez y Alejandro Rojo por compartir conmigo toda la carrera, por las pláticas profundas y por su apoyo desinteresado en múltiples ocasiones.

Al Dr. Luis Felipe por ser un ejemplo a seguir como académico y principalmente como persona, por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza para desarrollar este proyecto y por el tiempo dedicado.

A la Dra. María de Lourdes Segura Valdez por abrirme las puertas de su laboratorio, por siempre ser amable y por el tiempo dedicado.

A la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno por adiestrarme en la microscopía electrónica, por su tiempo y por hacerme reflexionar en múltiples ocasiones.

A la Dra. Reyna Lara Martínez por el tiempo dedicado, por el material prestado, por ser amable y por los valiosos consejos técnicos.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
I. RESUMEN	- 1 -
II. INTRODUCCIÓN	- 2 -
Breve introducción al reino de los hongos	- 2 -
<i>Ustilago maydis</i> : el hongo causante del carbón común.....	- 4 -
Clasificación de <i>Ustilago maydis</i>	- 5 -
Desarrollo histórico del estudio de <i>Ustilago maydis</i>	- 5 -
Ultraestructura nucleolar	- 6 -
Ciclo de vida y reproducción	- 6 -
Genoma.....	- 8 -
Formación del tumor.....	- 8 -
Fijación de nitrógeno y simbiosis.....	- 8 -
Organismo Modelo	- 9 -
<i>Pleurotus</i> , hongo comestible	- 9 -
Ultraestructura nucleolar	- 10 -
Clasificación de <i>Pleurotus</i>	- 10 -
Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> sp.	- 11 -
Núcleo celular.....	- 12 -
Cuerpos nucleares	- 14 -
Biogénesis de cuerpos nucleares.....	- 14 -
Generalidades de cuerpos nucleares.....	- 14 -
Nucléolo.....	- 15 -

Antecedentes históricos del nucléolo	- 16 -
Dinámica nucleolar	- 17 -
Tipos de nucléolo desde un punto de vista ultraestructural	- 20 -
Ultraestructura nucleolar y compartimentalización de procesos génicos	- 20 -
Componente fibrilar denso	- 20 -
Centros fibrilares	- 21 -
Componente granular	- 21 -
III. HIPÓTESIS	- 22 -
IV. OBJETIVO GENERAL	- 23 -
Objetivos particulares	- 23 -
V. METODOLOGÍA.....	- 23 -
Fijación y postfijación	- 23 -
Inclusión en Epón	- 23 -
Corte.....	- 24 -
Contraste	- 24 -
VI. RESULTADOS	- 24 -
VII. DISCUSIÓN.....	- 31 -
VIII. CONCLUSIONES	- 33 -
X. REFERENCIAS	- 33 -

Índice de figuras

	Pág
Figura 1. Principales grupos de hongos.....	3
Figura 2. Filogenia y clasificación de los basidiomicetos.....	4
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	7
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> sp.	12
Figura 5. Núcleo celular de célula animal.....	13
Figura 6. Nucléolo en célula fúngica.....	22
Figura 7. Micrografías electrónicas de <i>Ustilago maydis</i>	25
Figura 8. Nucléolo de <i>Ustilago maydis</i>	26
Figura 9. Nucléolo de <i>Pleurotus</i> sp.	27
Figura 10. Célula de <i>Pleurotus</i> sp.	28
Figura 11. Nucléolo de <i>Pleurotus</i> sp.	29

Índice de cuadros

	Pág
Cuadro 1. Cuerpos nucleares conocidos.....	14

Abreviaturas

Mb	Mega bases
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RNP	Ribonucleoproteina
RNA	Ácido ribonucleico
pre-RNA	Precursor de ácido ribonucleico
<i>Alu</i>RNA	Regiones no codificantes de ácido ribonucleico enriquecido de elementos <i>Alu</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
snoRNA	Pequeño ácido ribonucleico nucleolar
snoRNP	Pequeña ribonucleoproteina nucleolar
SRP	Partícula de reconocimiento de señal
pH	Potencial de hidrogeno
°C	Grados centigrados

I. Resumen

El nucléolo es un dominio nuclear conservado en eucariontes y formado alrededor de los genes ribosomales al término de la mitosis. En él ocurre la transcripción y maduración del pre-rRNA, la biogénesis de las subunidades grandes y pequeñas de los ribosomas, así como su ensamblaje. El nucléolo se encuentra organizado en distintos territorios ultraestructurales denominados centros fibrilares (CF), componente fibrilar denso (CFD) y componente granular (CG). En este trabajo se estudió el nucléolo de los hongos basidiomicetos *Ustilago maydis*, un hongo fitopatógeno, biotrófico y dimórfico, causante de la enfermedad del carbón común en el maíz y *Pleurotus* sp. un hongo de importancia económica y alimentaria, con la finalidad de caracterizar y conocer sus componentes ultraestructurales nucleolares. Se realizaron observaciones con microscopía electrónica de transmisión. En ambas especies el nucléolo estuvo constituido por material intranuclear, periférico, fibrogranular y no se observaron centros fibrilares. Además, se discuten posibles causas a la presencia de dos componentes ultraestructurales en estos hongos.

II. Introducción

Breve introducción al reino de los hongos

Los hongos pueden desarrollarse en una gran cantidad de hábitats (casi cualquiera), son capaces de establecer relaciones simbióticas con animales, plantas, bacterias, protistas e incluso con otros hongos. Se considera que las regiones tropicales son los sitios más diversos de este grupo. Por otra parte, su papel como descomponedores es de gran relevancia en el mantenimiento de los ecosistemas. El tamaño de su genoma oscila entre 30 Mb y 40 Mb (Stajich *et al.*, 2009).

Se ha sugerido con base en análisis filogenéticos de rDNA que el reino Fungi surgió hace alrededor de 1,000 millones de años (Blackwell, 2010), al separarse una población de eucariontes unicelulares acuáticos. Dicha separación resultó en la formación de dos linajes que con el tiempo darían origen a los hongos y a los animales. La capacidad de ambos grupos de formar organismos multicelulares surgió de forma independiente, en lo que podría considerarse un proceso evolutivo (Taylor *et al.*, 2004). Por otra parte, el registro fósil sugiere que comunidades de hongos bien establecidas tuvieron lugar durante el Devónico. Posteriormente, en el Carbonífero con la diversificación de plantas e insectos alados, los hongos también diversificaron debido a las estrechas relaciones con dichos grupos. Actualmente, las plantas son hospederas de algunas especies de hongos, mientras que, los insectos suelen dispersar a las esporas (Blackwell, 2010).

Se estima que pueden existir hasta 5 millones de especies de hongos, de las cuales han sido descritas 99,000 (Blackwell, 2011). Dichas especies se encuentran clasificadas en: 1 reino, 1 subreino, 7 phyla, 10 subphyla, 35 clases, 12 subclases y 129 ordenes (Hibbett *et al.*, 2007). El desarrollo tecnológico y metodológico ha permitido ampliar el conocimiento sobre los hongos; sin embargo, en múltiples ocasiones se ha determinado que las hipótesis establecidas anteriormente por los micólogos a partir de características morfológicas son congruentes con datos nuevos principalmente pertenecientes al campo de la biología molecular (Blackwell, 2011).

Dos de los grupos de hongos con mayor cantidad de especies son los basidiomicetos y los ascomicetos, ambos se encuentran clasificados en el subreino “Dikarya” (Fig. 1) y las hifas dicarióticas que presentan son consideradas una sinapomorfía (Hibbett *et al.*, 2007). Los basidiomicetos pasan gran parte de su ciclo de vida en estado dicariótico, mientras que, los ascomicetos una parte menor (Stajich *et al.*, 2009).

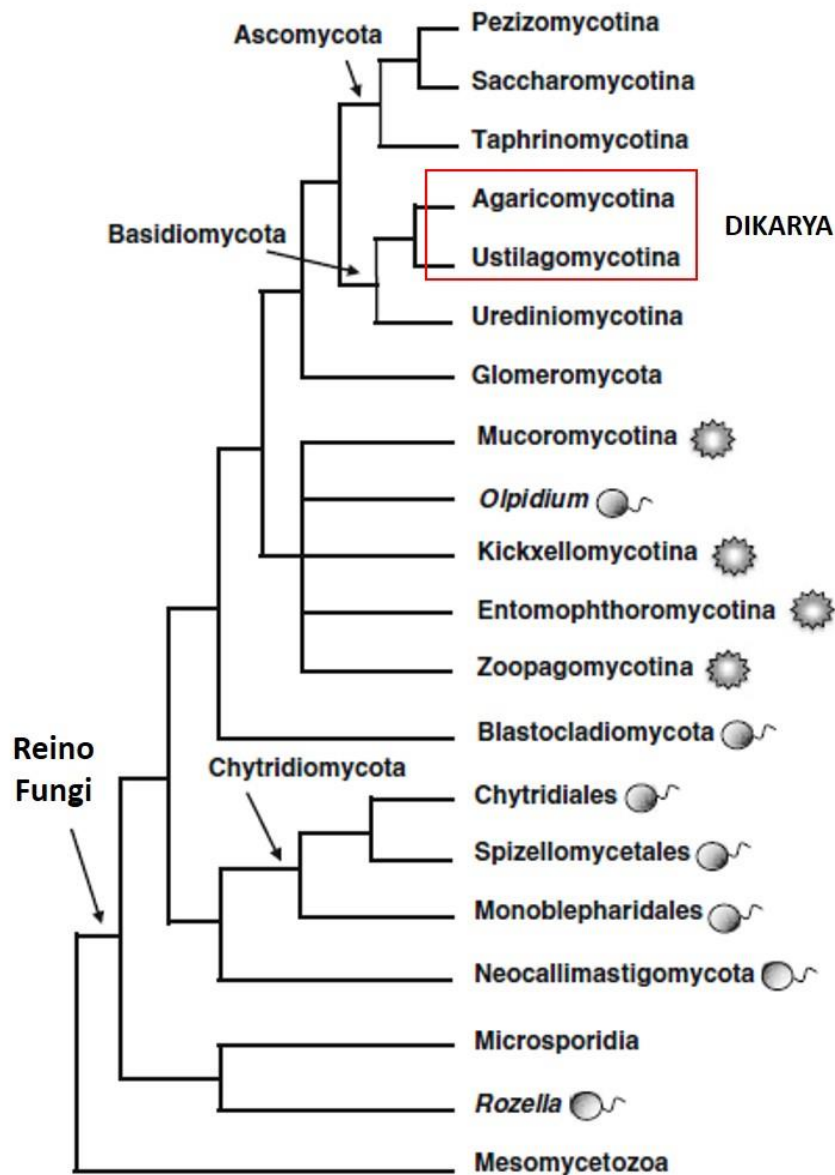


Figura 1. Principales grupos de hongos. Modificada de (Blackwell, 2010).

Los basidiomicetos son un grupo monofilético (Taylor *et al.*, 2004), compuesto aproximadamente por 30,000 especies, entre las que se encuentran hongos fitopatógenos, comestibles, levaduriformes, entre otros (Blackwell, 2010). El ancestro de este grupo posiblemente fue un parásito. En este linaje se incluye a *Ustilago maydis* y a diversas especies del género *Pleurotus* las cuales son cercanas respecto a otro grupo como los ascomicetos pero lejanas respecto a especies pertenecientes a los subphylum Agaricomycotina y Ustilaginomycotina (Fig. 2) en los cuales se agrupan (Hibbett *et al.*, 2007).

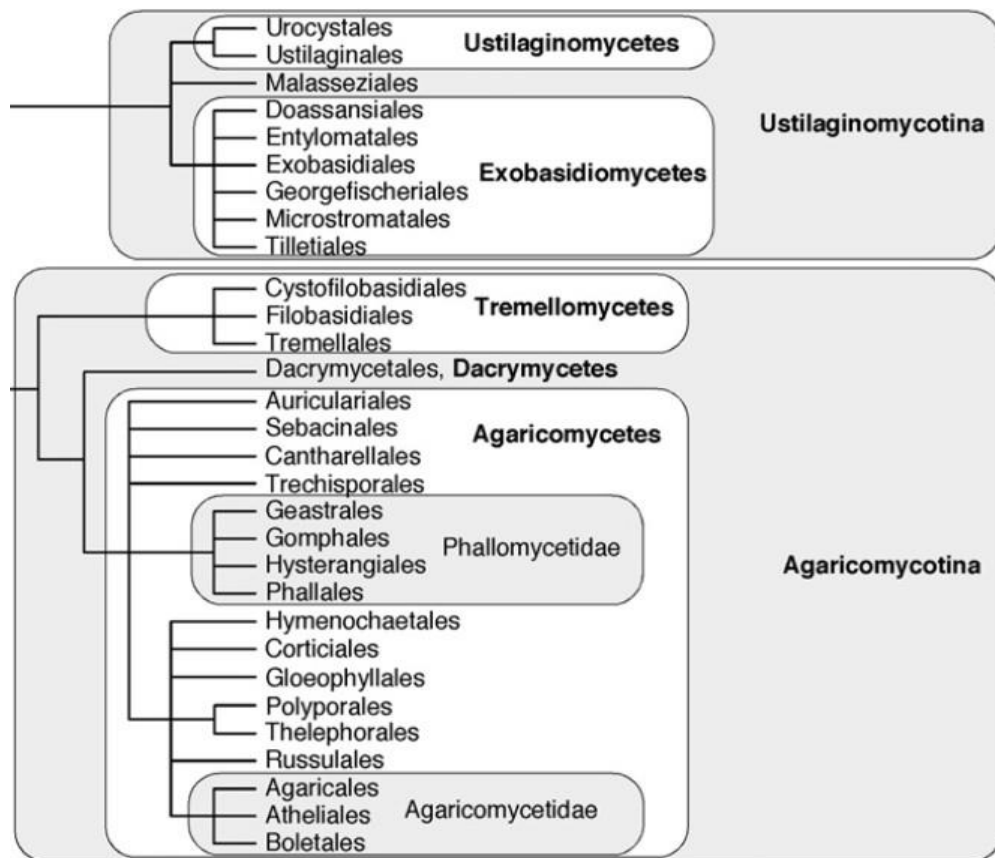


Figura 2. Filogenia y clasificación de los basidiomicetos. Modificada de Hibbet *et al.*, 2007.

Ustilago maydis: el hongo causante del carbón común

U. maydis es un hongo microscópico, biotrófico y dimórfico causante de la enfermedad del carbón común en *Zea mays*, la enfermedad es conocida en México como huitlacoche (Ruiz Herrera-2008). Puede distribuirse en cualquier lugar donde

se encuentre el maíz. Una de las características de esta enfermedad es la formación de tumores en los órganos aéreos de la planta (Kämper *et al.*, 2006). Actualmente, existe discrepancia en la clasificación de este hongo, debido a que análisis filogenéticos recientes sugieren que el hongo mitospórico *Pseudozyma prolifica* y *Ustilago maydis* son especies conespecíficas. Además, se ha sugerido utilizar el nombre *Mycosarcoma maydis* debido a su lejana relación con especies del género *Ustilago* (McTaggart *et al.*, 2016).

Clasificación de Ustilago maydis

Reino: Fungi R.T. Moore, 1980

Subreino: Dikarya Hibbett, T.Y. James & Vilgalys, 2007

Phylum: Basidiomycota R.T. Moore, 1980

Subphylum: Ustilaginomycotina Doweld, 2001

Clase: Ustilaginomycetes R. Bauer, Oberw. & Vánky, 1997

Orden: Ustilaginales G. Winter, 1880

Género: *Ustilago* (Pers.) Roussel, 1806

Especie: *Ustilago maydis* (DC.), 1842

La clasificación fue obtenida de la base de datos Index Fungorum (www.indexfungorum.org).

Desarrollo histórico del estudio de Ustilago maydis

El estudio formal de *U.maydis* comenzó en 1836 cuando Unger determinó que la enfermedad observada en las plantas del maíz era producida por el hongo *Ustilago zaeae*, el nombre fue modificado en 1944 por Stevenson y Johnson, quienes introdujeron el término *Ustilago maydis*, congruente con las reglas internacionales de nomenclatura botánica. Posteriormente, en 1949 David Perkins inicio los estudios genéticos con *U.maydis*, pero fue a partir de los trabajos de Holliday (1961; 1974) que se establecieron modelos de recombinación genética (Ruiz Herrera-2008). El avance en el estudio de *U.maydis* ha estado acompañado del desarrollo tecnológico, por lo que trabajos realizados con microscopia electrónica y

ultraestructurales fueron más abundantes en el pasado (Ramberg y McLaughlin, 1980), mientras que, trabajos relacionados con el genoma y con análisis bioinformáticos de las secuencias de *U.maydis* son más comunes en tiempos recientes (Lanver *et al.*, 2018).

Ultraestructura nucleolar

El nucléolo de *U. maydis* ha sido observado y mencionado en múltiples estudios. Dichos estudios enriquecieron el conocimiento celular y ultraestructural de este hongo; sin embargo, en ninguno se aborda al nucléolo como punto central de la investigación. Estudiar su nucléolo permitiría ampliar el conocimiento acerca del nucléolo del reino Fungi. Así mismo, es posible observar que el nucléolo de *U.maydis* se presenta generalmente uno por cada núcleo y se encuentra en la periferia intranuclear; sin embargo, en el trabajo de Snetselaar y Mims (1994) pueden observarse dos nucléolos al ocurrir la fusión nuclear. El tamaño del nucléolo ha sido estimado entre 0.8-1.5 μm , ocupando aproximadamente del 15-20 % del volumen nuclear (Ramberg y McLaughlin, 1980; O'Donnell y McLaughlin, 1984a; O'Donnell y McLaughlin. 1984b; Snetselaar y Mims. 1993; Snetselaar y Mims. 1994; Ruiz-Herrera *et al.*,1995).

Ciclo de vida y reproducción

U.maydis crece en forma de levaduras haploides y cambia a micelio diploide (Fig. 3). Cuando *U.maydis* se encuentra en etapa levaduriforme (esporidia), las células son alargadas y obtienen nutrientes de la materia orgánica en descomposición. Su crecimiento ocurre por gemación. Posee un sistema de compatibilidad tetrapolar que es dirigido por los loci *a* y *b*. El locus *a* tiene dos alelos (*a1* y *a2*). Los alelos *a1* y *a2* son muy parecidos por lo que son denominados idiomorfos, ambos codifican los precursores de hormonas sexuales, de las que depende la fusión entre dos células haploides que consecuentemente forman tubos de conjugación y dan lugar al micelio dicariótico, el cual posee la capacidad de infectar a un huésped. Se considera que *U.maydis* infecta a *Z.mays* principalmente por los estigmas, aunque también puede infectar por estomas, heridas, órganos florales o con la formación de un apresorio. Por otra parte, el locus *b* posee múltiples

alelos y gobierna el crecimiento filamentoso, el desarrollo sexual y la patogenicidad. En él se reconocen dos polipéptidos *bE* y *bW* los cuales dan lugar a un factor de transcripción específico en el proceso infeccioso (Klosterman *et al.*, 2007). Al introducirse en la planta, el micelio dicariótico de *U. maydis* continúa su desarrollo principalmente en tejidos meristemáticos hasta que ocurre la fusión nuclear y las hifas formadoras de micelio (ahora diploide) se deforman y se fragmentan. Posteriormente, se forman las teliosporas, las cuales son diploides, negras y con una pared celular gruesa que presenta ornamentaciones. Las teliosporas diploides salen al romperse el tejido vegetal y fuera de la planta forman al promicelio, en el cual ocurre la meiosis y se forman generalmente cuatro basidiosporas de las cuales se forman células levaduriformes independientes y reinicia el ciclo de vida (Steinberg y Perez-Martin, 2008).

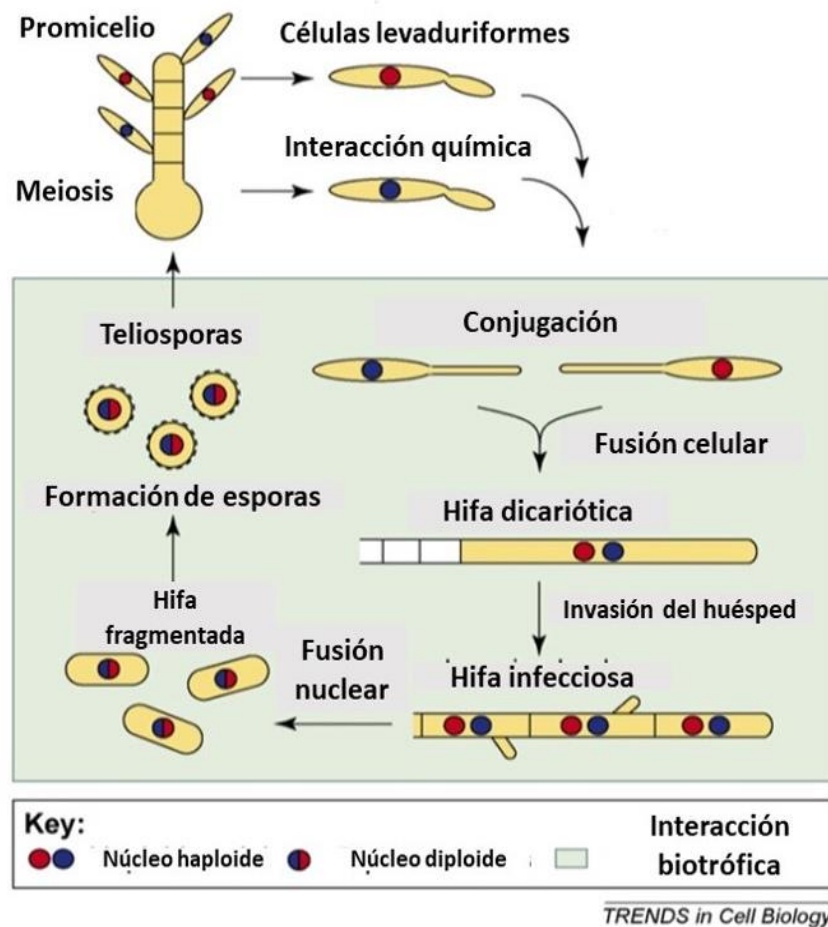


Figura 3. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Modificada de Steinberg y Perez-Martin, 2008.

Genoma

El genoma haploide de *U.maydis* se encuentra constituido por 19,8 mega pares de bases y está distribuido en 23 cromosomas, de los cuales solo el 4 contiene rDNA. Este genoma almacena alrededor de 6500 genes y es pequeño en comparación al de otros hongos patógenos de plantas, esto se debe a que la cantidad de genes duplicados e intrones es mínima (Kämper et al., 2006).

Formación del tumor

Para que pueda ocurrir el proceso infeccioso promovido por *U.maydis*, es necesario que el hongo secrete proteínas efectoras que afecten el sistema inmune de la planta. Durante la invasión del huésped, actúan efectores generales y consecutivamente actúan los efectores específicos que participan en el desarrollo de la enfermedad (Matei et al., 2018). Por otro lado, las plantas del maíz suelen producir antocianinas al presentarse la infección por *U. maydis* (Lanver et al., 2017)

Dentro del genoma de *U.maydis*, los genes efectores se ubican en regiones poco conservadas respecto al resto del genoma y la expresión de dichos genes cambia constantemente por la interacción que sostiene con la planta de *Z.mays* (Lanver et al., 2017). See1 es el primer efector fúngico que se identificó en *U.maydis* (Redkar et al., 2015) y que participa en la reactivación del ciclo celular de las células de la vaina del haz vascular y por lo tanto en el desarrollo del tumor. Se distribuye en el citoplasma y en el núcleo de las células del maíz. Otros efectores son: Pit2, Tin2 y Cmu1 (Matei y Doehlemann, 2016).

Por otra parte, en las células pertenecientes a la vaina del haz vascular se originan las células tumorales hiperplásicas, mientras que, las células tumorales hipertróficas se originan del mesófilo (Matei et al., 2018).

Fijación de nitrógeno y simbiosis

Recientemente se reportó que *U. maydis* puede crecer en medios con nitrógeno, lo cual sugirió una actividad nitrogenasa en su etapa levaduriforme y también en la micelial. Los cambios parecen reflejarse de forma menor en el transcriptoma (Sánchez-Arreguin et al., 2017). Sin embargo, la capacidad de fijar nitrógeno no es propia del hongo, depende de la bacteria endosimbionte *Bacillus*

pumilus la cual fija el nitrógeno. Esto fue corroborado por técnicas de microscopía y con la amplificación de dos genes 16S del rRNA y *nifH* y fue el primer reporte entre la asociación de un hongo y una bacteria endosimbionte en la fijación de nitrógeno (Ruiz-Herrera *et al.*, 2015).

Organismo Modelo

Dos características que facilitan el estudio de procesos genéticos y moleculares en *Ustilago maydis* son:

1. Formación de fase haploide, el hongo forma colonias compactas y su manejo en el laboratorio es sencillo.
2. Formación de fase diploide de forma artificial, permite realizar exámenes de dominancia y complementación.

Otra característica importante que hace a *U. maydis* un modelo es su ciclo de vida en el que sufre múltiples transformaciones a nivel celular y molecular (Ruiz Herrera-2008).

A partir de los modelos de recombinación genética de Robin Holiday en 1961 y 1974, han sido múltiples los procesos estudiados en *U. maydis*, principalmente en la patogénesis de plantas (Brefort *et al.*, 2009). Sin embargo, en otros estudios se ha sugerido a *U. maydis* como un organismo modelo en procesos celulares de mamíferos, ya que a diferencia del organismo modelo *S.cerevisiae* con mitosis cerrada, la envoltura nuclear en *U. maydis* se rompe. Así mismo, se considera que *U. maydis* y mamíferos comparten proteínas que no están presentes en *S. cerevisiae* (Steinberg y Perez-Martin, 2008).

Actualmente los estudios de *U. maydis* están enfocados principalmente al entendimiento de su genoma, su metabolismo, estrategias nutricionales, tráfico endosomal, interacciones RNA-proteína, regulación del ciclo celular y redes reguladoras del desarrollo fúngico (Matei y Doehlemann, 2016; Lanver *et al.*, 2018).

Pleurotus, hongo comestible

El género *Pleurotus* comprende un grupo cosmopolita de especies de hongos comestibles que pueden ser saprófitos o parásitos. Como alimento, se sabe que es rico en proteínas, fibra, vitaminas y minerales. La importancia de estos hongos es

diversa, algunas moléculas que secretan poseen actividad de importancia médica, mientras que otras, pueden participar en la degradación de algunos contaminantes (Cohen *et al.*, 2002). Así mismo, participan como alimento en distintos lugares. El principal productor a nivel mundial es China (Sánchez y Royse, 2017). Por otro lado, en México durante 2009 se produjeron 2920 toneladas (Guadarrama-Mendoza *et al.*, 2014).

Las especies de *Pleurotus* son capaces de colonizar una gran cantidad de sustratos (principalmente con cantidades bajas de nitrógeno), lo cual se debe en parte a su plasticidad en el estilo de vida y en parte a su eficacia en la producción de enzimas ligninolíticas, como lacasas y peroxidasas entre muchas otras. Crecen en distintos intervalos de temperatura, oscilando entre los 15-31°C y en sitios con escasa iluminación. En condiciones artificiales, se ha encontrado que el pH de 6.5 y 7.0 facilita el crecimiento de múltiples especies del género, mientras que, altas cantidades de fenol inhiben el crecimiento (Rajarathnam *et al.*, 1987).

El tamaño del genoma y el número de cromosomas de la especie *Pleurotus ostreatus*, una de las mejor estudiadas del grupo, no es claro. Sin embargo, se considera que el genoma mide alrededor de 31 mega pares de bases (Larraya *et al.*, 1999).

Ultraestructura nucleolar

Los estudios ultraestructurales de *P. ostreatus* son escasos. No obstante, se sabe que el nucléolo se conserva mientras el núcleo se encuentra en migración. El nucléolo generalmente es uno por célula (Yoon y Kim, 1994).

Clasificación de Pleurotus

Reino: Fungi R.T. Moore, 1980

Subreino: Dikarya Hibbett, T.Y. James & Vilgalys, 2007

Phylum: Phylum: Basidiomycota R.T. Moore, 1980

Subphylum: Agaricomycotina Doweld, 2001

Clase: Agaricomycetes Doweld, 2001

Orden: Agaricales Underwood, 1899

Género: *Pleurotus* (Fr.) P. kumm, 1871

Especie: *Pleurotus* sp.

La clasificación fue obtenida de la base de datos Index Fungorum (www.indexfungorum.org).

Por otra parte, las relaciones filogenéticas entre las especies del género y por lo tanto la taxonomía del grupo no ha sido clara. De acuerdo con Bao y colaboradores (2004) esto se debe a los siguientes factores: identificación errónea inicial, ausencia de muestras tipo en buenas condiciones, caracteres morfológicos cambiantes e informes limitados. Las técnicas de secuenciación y herramientas bioinformáticas han pretendido solucionar estas complicaciones (Pawlik *et al.*, 2012; Béatrice y Georgios, 1995).

Ciclo de vida de Pleurotus sp.

El ciclo de vida de las especies del género *Pleurotus* es muy similar al de otros basidiomicetos (Fig.4). El esporoma se forma a partir del micelio heterocarionte (también llamado secundario). Los esporomas de *Pleurotus* pueden ser pequeños o grandes, pueden medir de 2cm a 20cm de ancho, presentan un estípite que puede ser pequeño, largo o incluso no presentarse. Generalmente, el estípite de este grupo carece de volva y anillo. El margen del pileo puede ser liso, aserrado o dentado. El color es una característica poco relevante ya que incluso una misma especie puede variar en color de acuerdo con la cantidad de nutrientes. Por otro lado, en el himenóforo se sitúan células dicarióticas especializadas llamadas basidios, en dichas células ocurre primero la cariogamia (fusión nuclear) y después la meiosis de la cual resultan cuatro esporas exógenas (basidiosporas) cada una con un núcleo. Al germinar las basidiosporas, surge el micelio homocarionte (primario o monocariótico). Posteriormente, la integración de dos micelios monocariontes por medio de un proceso llamado plasmogamia dará lugar al micelio heterocarionte (dicariótico) que formará al basidioma. El ciclo se repite (Herrera y Ulloa, 1998; Rajarathnam *et al.*, 1987). En general, las especies del género *Pleurotus* poseen un sistema de compatibilidad tetrapolar (bifactorial), con alelos múltiples (Huerta *et al.*, 2009).

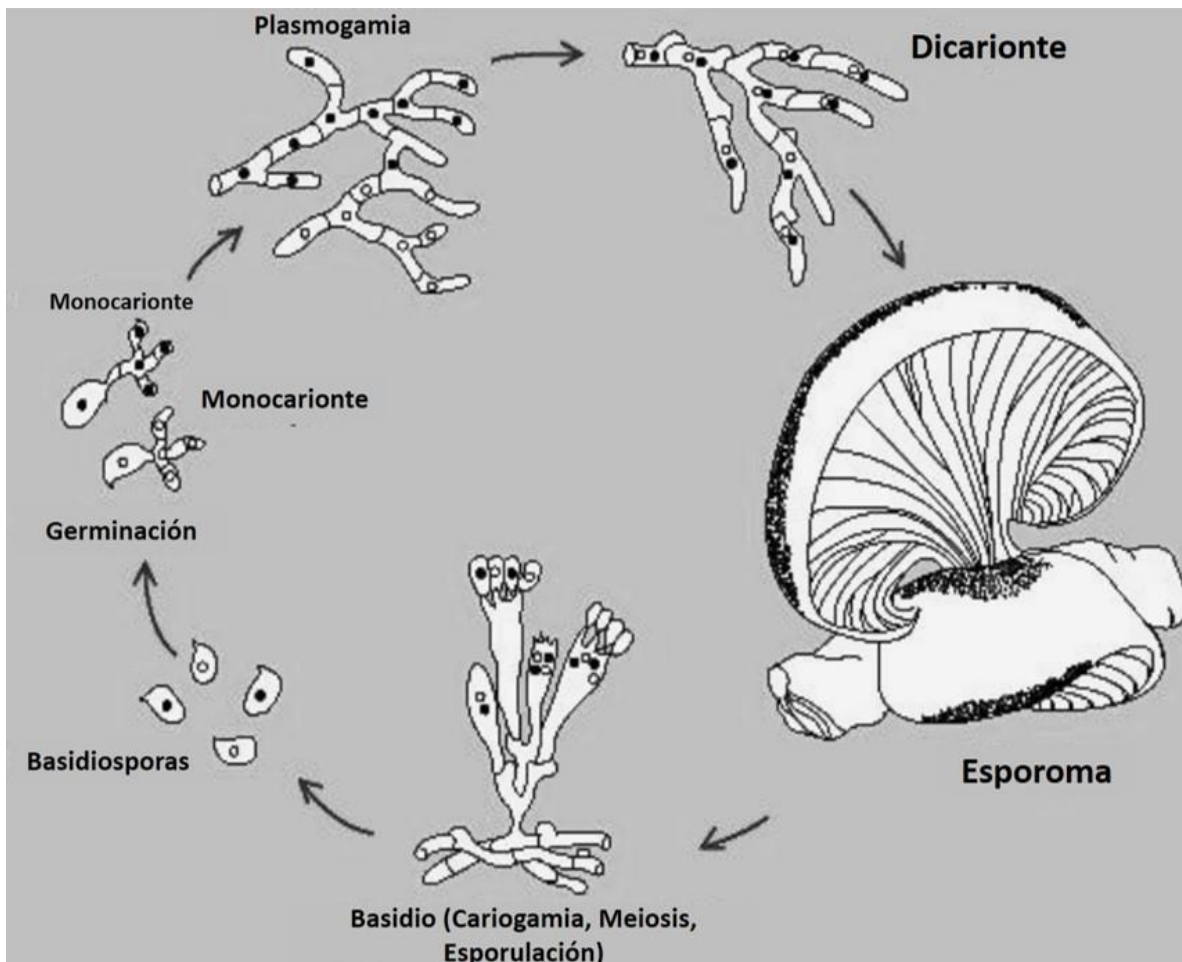


Figura 4. Ciclo de vida de *Pleurotus* sp. Modificada de Martínez-Carrera, 1999

Núcleo celular

El primero en observar el núcleo posiblemente fue Antony van Leeuwenhoek en 1710 al desarrollar sus lentes de alta calidad y por lo que se le considera el padre de la microscopia. Posteriormente, múltiples personas como: Franz Bauer y Jan Purkyne dibujaron y señalaron el núcleo, sin embargo; fue Robert Brown quien asignó el término núcleo en 1833 al observarlo en plantas (Pederson, 2011).

El núcleo celular (Fig. 5) es un organelo membranoso, que generalmente ocupa gran parte del volumen celular. Es una de las características que divide a los seres vivos en dos grandes grupos: eucariontes y procariontes. En los eucariontes se agrupan: hongos, animales, plantas y protistas, los cuales poseen la estructura nuclear. Por otra parte, la estructura nuclear está compuesta principalmente por una envoltura con una doble membrana en la que se forman pequeñas aberturas denominadas poros nucleares. Al interior de la envoltura se encuentra una lámina compuesta de filamentos intermedios. Cada una de estas estructuras da forma al núcleo y participa en su dinámica. El núcleo funciona como almacén de la mayor parte del genoma, en él ocurren procesos tales como la replicación y la transcripción, esenciales en el flujo y expresión de la información génica (Jackson, 2012).

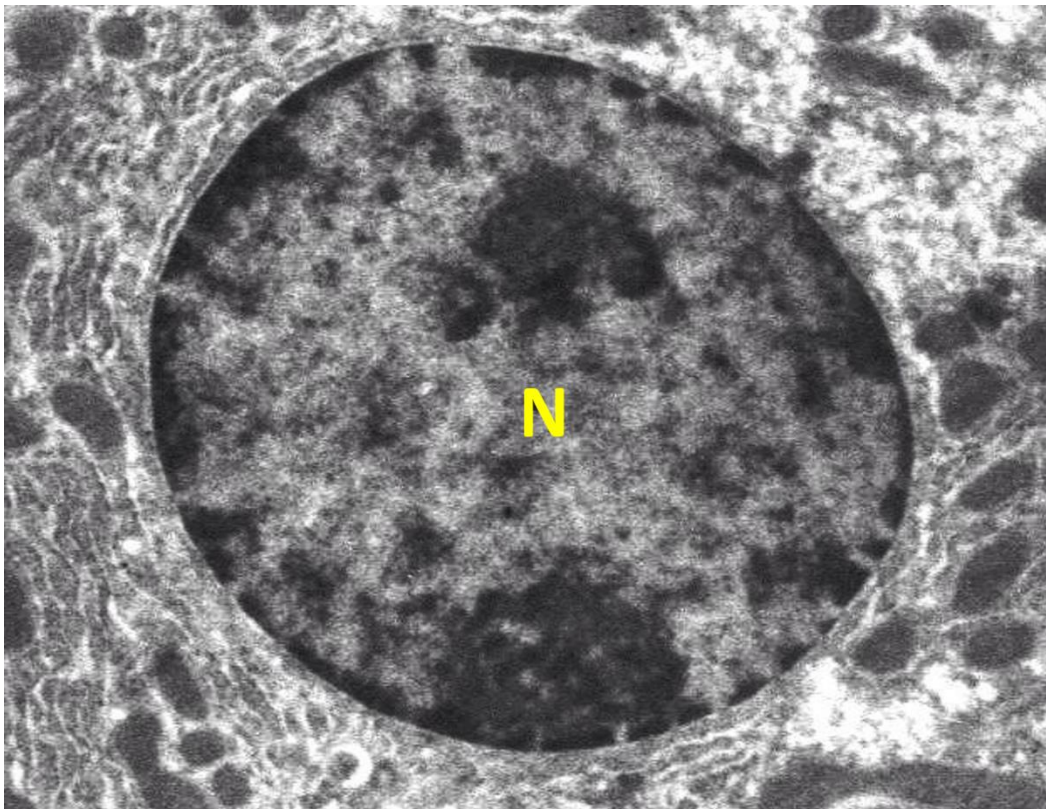


Figura 5. Núcleo celular de un hepatocito. Núcleo (N) (Micrografía tomada por O. Said Quiroz Zerecero, 2016).

Cuerpos nucleares

Los cuerpos nucleares son dominios intranucleares donde se agrupan y localizan proteínas y moléculas de RNAs. Generalmente, cumplen las siguientes características:

1. Son visibles en alguna etapa del ciclo celular y carecen de algún tipo de membrana.
2. Concentran factores nucleares específicos, generalmente intercambian sus componentes.

Hasta el momento si cumplen alguna función no es totalmente claro, sin embargo; se considera que participan en el metabolismo nuclear (Staněk y Fox, 2017).

Biogénesis de cuerpos nucleares

Se considera que pueden existir dos vías para la formación de cuerpos nucleares. La primera sugiere que la formación ocurre tras la unión ordenada de sus constituyentes, donde cada elemento posee características distintivas que definen de qué manera ocurre la unión. Por otra parte, el modelo de ensamblaje estocástico sugiere que los elementos del cuerpo nuclear interactúan sin un orden jerárquico (Mao *et al.*, 2011).

Generalidades de cuerpos nucleares

En la siguiente tabla se agrupan las características de distintos cuerpos nucleares:

Nombre del cuerpo nuclear	Número de cuerpo/célula	Tamaño común (µm)	Componentes	Funciones putativas
Cuerpos de Cajal	0-10	0.1-2.0	Coilina, SMN	Participación en modificaciones de snRNAs, snoRNAs. Formación y transporte de snRNPs y snoRNPs. Participación en el ensamblaje de la telomerasa
Clastosoma	0-3	0.2-1.2	19S, 20S proteosoma	Ubicación de las unidades 20S y 19S del proteosoma
Cuerpos de locus de histonas	2-4	0.2-1.2	NPAT, FLASH	Participación en la transcripción y en el procesamiento del pre-mRNAs
Speckles	25-50	0.8-1.8	SRSF2, SFSF1, Malat1	Involucrados en el almacenamiento, ensamblaje y modificación de los factores de splicing
Cuerpo de estrés	2-10	0.3-3.0	HSF1, HAP	Función no determinada. Formado en respuesta al estrés
Nucléolo	1-4	0.5-8.0	Maquinaria de la RNA Pol I	Participación en la transcripción, procesamiento del rRNA, ensamblaje de ribosomas, modificaciones a otros RNA nucleares y RNP
Paraspeckle	10-20	0.5	PSP1, p54nrb	Involucrado en la retención de algunos mRNAs
Compartimento perinucleolar	1-4	0.2-1.0	PTB, CUGBP	Asociado a la capacidad metastática
PML	10-30	0.3-1.0	PML	Involucrado en respuesta a muchas formas de estrés, defensa viral y estabilidad del genoma mediante la retención, modificación y degradación de proteínas asociadas
Cuerpo Polycomb	12-16	0.3-1.0	Bmi1, Pc2	Apareamiento y silenciamiento de genes

Cuadro 1. Cuerpos nucleares conocidos. Modificada de Mao *et al.*, 2011.

Nucléolo

El nucléolo (Fig.6) es un prominente dominio nuclear carente de membranas que se forma alrededor de genes ribosomales. En la mayoría de los eucariontes la estructura del nucléolo se conforma de tres elementos: componente granular (CG), componente fibrilar denso (CFD) y centros fibrilares (CF) (Boisvert *et al.*, 2007). En él ocurre la síntesis de ribosomas, así como la transcripción y maduración del pre-rRNA que han sido las funciones históricamente relacionadas con el nucléolo, sin embargo; actualmente, se reconoce al nucléolo como una entidad nuclear multifuncional. Algunas funciones adicionales son: participación en la biogénesis de RNPs no ribosómicas, regulación del ciclo celular, reparación del DNA, procesamiento y en ocasiones exportación de moléculas de tRNA, mRNA y SRPs (partículas de reconocimiento de señal). Simultáneamente, se considera que existen al menos 4500 proteínas que interactúan con el nucléolo de las cuales, el 70% no participa en la biogénesis de ribosomas. Recientemente, se propuso que regiones no codificantes denominadas *AluRNAs* forman algo semejante a un esqueleto nucleolar. Lo anterior es apoyado por estudios en los que se ha

observado que proteínas nucleolares se unen a los *Alu*RNAs y que cuando se sobre expresan dichas regiones se obtienen como resultados nucléolos de gran tamaño y altos niveles de pre-rRNA (Sirri *et al.*,2008; Hein *et al.*, 2013; Németh y Grummt, 2018).

Los estudios en animales y plantas son abundantes; sin embargo, en hongos son relativamente escasos (Trumtel *et al.*, 2000).

Antecedentes históricos del nucléolo

Felice Fontana fue el primero en realizar una descripción del nucléolo durante 1781 en su manuscrito "*Traite sur le Venin de la Viper, sur les Poisons Americains, sur le Laurier-Cerise et sur Quelques Autres Poisons Vegetaux*", donde simultáneamente observó el núcleo en células epidérmicas de anguila (Pederson, 2011; Tsekrekou *et al.*, 2017). Fontana describió al nucléolo como una mancha central dentro de un cuerpo oviforme (Fontana, 1781; Mosgoeller, 2004).

De acuerdo con Pederson (2011) los primeros en documentar formalmente al nucléolo fueron Wagner en 1835 y Valentin en 1836 y 1839 en estudios independientes. Rudolph Wagner describió al nucléolo como una mancha en células foliculares de ovinos (Wagner, 1835; Dundr y Misteli,2002), llamándolo "Keimfleck" o punto germinal (Montgomery, 1898), mientras que, Gabriel Valentin observo células somáticas y menciona al nucléolo como un cuerpo esferoidal que asemeja un núcleo secundario dentro de otro (Valentin,1836; Leung y Lamond, 2003). Se considera que Valentin (1839) introduce los términos nucléolo y cuerpos centrales, paralelo a Schwann (1839) (Montgomery, 1898).

Posteriormente, Montgomery (1898) dio a conocer su monografía, donde dibujo 346 figuras entre núcleos y nucléolos de diferentes especies, por lo que su trabajo fue considerado como el más relevante durante décadas referente al nucléolo (Pederson, 2011).

Fue durante la década de 1930 que el nucléolo comenzó a recibir mayor atención. Anteriormente, distintos autores habían observado la relación estrecha entre el nucléolo y algunos cromosomas. Pero, fue Heitz (1931) quien colocó los cimientos al entendimiento de dicha relación, Heitz sugería que el nucléolo se

formaba durante la telofase en las constricciones secundarias o en los tallos satelitales de cromosomas. Además, consideraba que el número de nucléolos dependía de la cantidad de cromosomas SAT. McClintock (1934), discrepaba sobre las observaciones de Heitz y aunque reconoció que gracias a sus aportaciones el entendimiento en el origen del nucléolo mejoró, propuso que los nucléolos se formaban de un sitio organizado del cromosoma, cercano al tallo satelital y no en dicho tallo como había propuesto Heitz. Además, McClintock observó que los organizadores nucleolares podían encontrarse segmentados en distintos cromosomas y que el tamaño del nucléolo no dependía de las dimensiones de los segmentos sino de su actividad funcional (McClintock, 1934).

Las aportaciones de Heitz y McClintock son fundamentales en el entendimiento del nucléolo como una entidad citogenética y dinámica, asociada a un locus cromosomal específico. También sugirió que los tamaños y formas nucleolares pueden estar determinados por los loci en los que surgen (Tsekrekou *et al.*, 2017).

Posteriormente, con la llegada del microscopio electrónico fue posible conocer al nucléolo y sus componentes desde un enfoque ultraestructural. Fue en 1952 cuando se dio la primera descripción de la ultraestructura nucleolar en células de vertebrados donde se podía observar el DNA y el RNA (Lo *et al.*, 2006).

Algo similar ocurre en la actualidad con las nuevas herramientas tecnológicas que han permitido conocer con mayor profundidad la dinámica del nucléolo (Tsekrekou *et al.*, 2017).

Dinámica nucleolar

El nucléolo es una estructura dinámica que sufre transformaciones moleculares y ultraestructurales a lo largo del ciclo celular (Sirri *et al.*, 2008).

En las primeras etapas de la profase, la envoltura nuclear entra en un proceso de desintegración y los cromosomas inician su formación, conjuntamente da inicio el proceso de desarticulación nucleolar marcado por la salida de las proteínas pertenecientes a los componentes fibrilar denso y granular. Durante la profase tardía, los nucléolos se desarticulan al interrumpirse la actividad de la RNA

polimerasa I (Pol I) y detenerse la transcripción del rDNA (Hernandez-Verdun, 2011).

Los elementos que participan en el mecanismo de transcripción permanecen asociados al rDNA en las regiones organizadoras nucleolares (NOR). En tanto que, los componentes involucrados en la formación de ribosomas y en el procesamiento del pre-RNA se distribuyen en el nucleoplasma. Se ha sugerido que los nucléolos se desensamblan por la fosforilación de los componentes de la maquinaria transcripcional del rDNA (Sirri *et al.*, 2008). La fosforilación parece ocurrir también en distintas proteínas como NPM/B23 que pierden afinidad con el RNA. Al final de la profase los nucléolos no pueden observarse en la célula animal (Hernandez-Verdun, 2011).

Posteriormente, cuando los cromosomas se encuentran en metafase, son cubiertos homogéneamente por una envoltura en la periferia, constituida de material nucleolar (DiMario, 2004). En células animales, algunos de los elementos identificados en dicha cubierta son: fibrilarina, U3, Nop52, NPM/B23, entre algunos otros. Así mismo, se ha documentado la presencia de proteínas ribosomales, snoRNAs y elementos del pre-RNA ribosomal (Hernandez-Verdun, 2011). Algunos estudios cuantitativos han propuesto que subunidades de la RNA polimerasa I (RPA39, RPA16, RPA194) se separan de los NOR temporalmente (Leung *et al.*, 2004).

La envoltura pericromosómica se conserva parcialmente en la anafase, ya que, algunos elementos ribonucleoproteicos nucleolares se concentran en el citoplasma en sitios denominados NDF (nucleolus-derived foci), mientras tanto, los cromosomas migran a los polos. Simultáneamente, las subunidades de la RNA Pol I separadas de los NOR en metafase son restauradas (Sirri *et al.*, 2008). Además, en la anafase algunos procesos de fosforilación provenientes de la profase son revertidos por fosfatasas. Un ejemplo son las proteínas NPM/B23 (Hernandez-Verdun, 2011).

En las etapas finales de la anafase y telofase temprana, los cromosomas pierden compactación, la envoltura pericromosómica se disgrega y sus

componentes dan lugar a cúmulos prenucleolares. Simultáneamente, la envoltura nuclear empieza a formarse y elementos de los NDF migran primero a la envoltura nuclear y después al nucleoplasma donde son incorporados a los cuerpos prenucleolares (DiMario,2004).

En la telofase, la formación del nucléolo “nucleologénesis” (Hernandez-Verdun, 2011), inicia con el ensamblaje de cuerpos pre-nucleolares constituidos de pre-RNA, snoRNPs y proteínas nucleolares (Carron *et al.*, 2012). A su vez, la formación del nucléolo parece depender de dos procesos, el inicio de la transcripción del rDNA y el procesamiento del rRNA. Ambos regulados por la presencia de CDKs (Sirri *et al.*, 2008).

De acuerdo con DiMario (2004), en la nucleologénesis destacan dos etapas.

1. El reclutamiento por parte de un complejo compuesto por organizadores nucleolares competentes y factores de transcripción de dos elementos: el pre-rRNA proveniente de la etapa G₂ y la maquinaria de procesamiento de pre-rRNA.
2. El transporte de elementos formadores de cuerpos prenucleolares a los nuevos nucléolos, en un proceso dependiente de la transcripción del rRNA.

En la interfase, durante la etapa G₁ la producción de ribosomas incrementa (Hernandez-Verdun, 2011) y los cuerpos prenucleolares comienzan a desaparecer (Carron *et al.*, 2012). Así mismo, en células HeLa se ha observado la fusión de nucléolos. Durante la etapa G₂ se alcanza la producción máxima de ribosomas. El proceso descrito anteriormente ha sido observado en células de mamíferos (Hernandez-Verdun, 2011).

El nucléolo interfásico puede poseer una organización ultraestructural tripartita o bipartita dependiendo de la especie y de la actividad celular (síntesis de ribosomas). En la organización tripartita pueden identificarse los siguientes componentes: componente granular, componente fibrilar denso y centros fibrilares. Sin embargo, en la organización bipartita se ha sugerido un solo componente fibrilar acompañado del componente granular (Thiry y Lafontaine, 2005).

El proceso de nucleogénesis ha sido descrito en múltiples organismos obteniendo diferentes resultados. En el caso del protista con mitosis cerrada *Trypanosoma cruzi*, la nucleogénesis parece ser un proceso continuo en el cual no se necesita de la formación de cuerpos prenucleolares (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2016). Un caso similar parece ocurrir en *Giardia lamblia* donde el material nucleolar se conserva a través del ciclo celular y no parecen formarse cuerpos prenucleolares (Lara-Martínez *et al.*, 2016). En el caso del hongo *Saccharomyces cerevisiae*, el nucléolo no se desarma durante la mitosis (DiMario,2004).

Tipos de nucléolo desde un punto de vista ultraestructural

Los nucléolos fueron categorizados por Smetana y Busch (1974) de acuerdo con la morfología ultraestructural en tres tipos:

1. Nucléolos anulares. Generalmente poseen un CF, rodeado de poco CFD y CG. Se considera que estos nucléolos poseen escasa actividad de síntesis ribosomal.
2. Nucléolos compactos. Se caracterizan por poseer una gran cantidad de CF embebidos en una red formada por el CFD. El CG ocupa gran parte de la periferia nucleolar. Estos nucléolos están asociados a una actividad sintética moderada-alta, sin embargo; podrían ser una etapa transitoria entre compacto-reticulado.
3. Nucléolos reticulados. El CFD es prominente, se presenta una gran cantidad de CG y los CF son pequeños y escasos. Además, pueden observarse espacios claros llamados intersticios. Generalmente, son nucléolos de gran tamaño, de alta actividad sintética.

Ultraestructura nucleolar y compartimentalización de procesos génicos

Componente fibrilar denso

El componente fibrilar denso (CFD) es un conjunto de material fibroso delgado, altamente condensado. En ocasiones da lugar a grandes redes alrededor de los centros fibrilares y generalmente ocupan gran parte del nucléolo. Bajo el microscopio electrónico de transmisión son sitios con un contraste notable. Dicho componente posee de 3nm a 5nm de espesor (Olson,2004). El CFD alberga

factores de procesamiento del pre-RNA como snoRNAs, snoRNP, fibrilarina, nucleolina y Nop58 (Boulon *et al.*, 2010). Así mismo en la frontera entre el CFD y los CF comienza el procesamiento del precursor 47S del rRNA (Sirri *et al.*, 2008; Boisvert *et al.*, 2007).

Centros fibrilares

Los centros fibrilares (CF) son redes esféricas, formadas por fibrillas muy finas. Generalmente tienen un tamaño de 50 nm a 1µm. Además, son sitios de bajo contraste ante el microscopio electrónico de transmisión (Olson, 2004). Se considera que en los CF se encuentra el rDNA activo (principalmente en la periferia) (Thiry *et al.*, 2011), así como la maquinaria de la RNA Pol I (Boulon *et al.*, 2010).

Componente granular

El componente granular (CG) se define como una región nucleolar conformada por pequeños gránulos de 15 nm a 20 nm aproximadamente, a él llegan los RNA provenientes del CFD. En el CG se forma la subunidad 60S del ribosoma tras la unión de los rRNA 5.8S y 28S con el transcrito de rRNA 5S. Así mismo la subunidad 18S se une a la 40S del ribosoma. Se sabe que las proteínas B23/NPM, PM-Scl 100 o rrp6 (en levaduras) se localizan en el CG y se ha sugerido que participan en etapas intermedias y tardías del procesamiento del rRNA. Pese a que el nucléolo es un dominio carente de estructuras membranosas, se considera que el CFD y los CF se encuentran embebidos en el CG (Boulon *et al.*, 2010).

El proceso de síntesis de ribosomas en el nucléolo se resume de la siguiente forma. Tras la transcripción de los genes ribosomales, ocurre la síntesis del precursor rRNA 47S que se procesa y modifica para formar los rRNA maduros 18S, 5.8S y 28S, que junto con el transcrito 5S de rRNA, y las proteínas ribosómicas (RP) transcritas por Pol II se ensamblan para formar las subunidades ribosómicas 40S y 60S. Al ser exportadas al citoplasma podrán dar lugar a ribosomas maduros 80S. En resumen, estructuralmente la transcripción de los genes ribosomales por la RNA pol I ocurre en los límites de los CF y el CFD, mientras que, el procesamiento del pre-rRNA y su posterior acoplamiento con proteínas ribosómicas ocurre en el CFD y en el CG (Németh y Grummt, 2018).

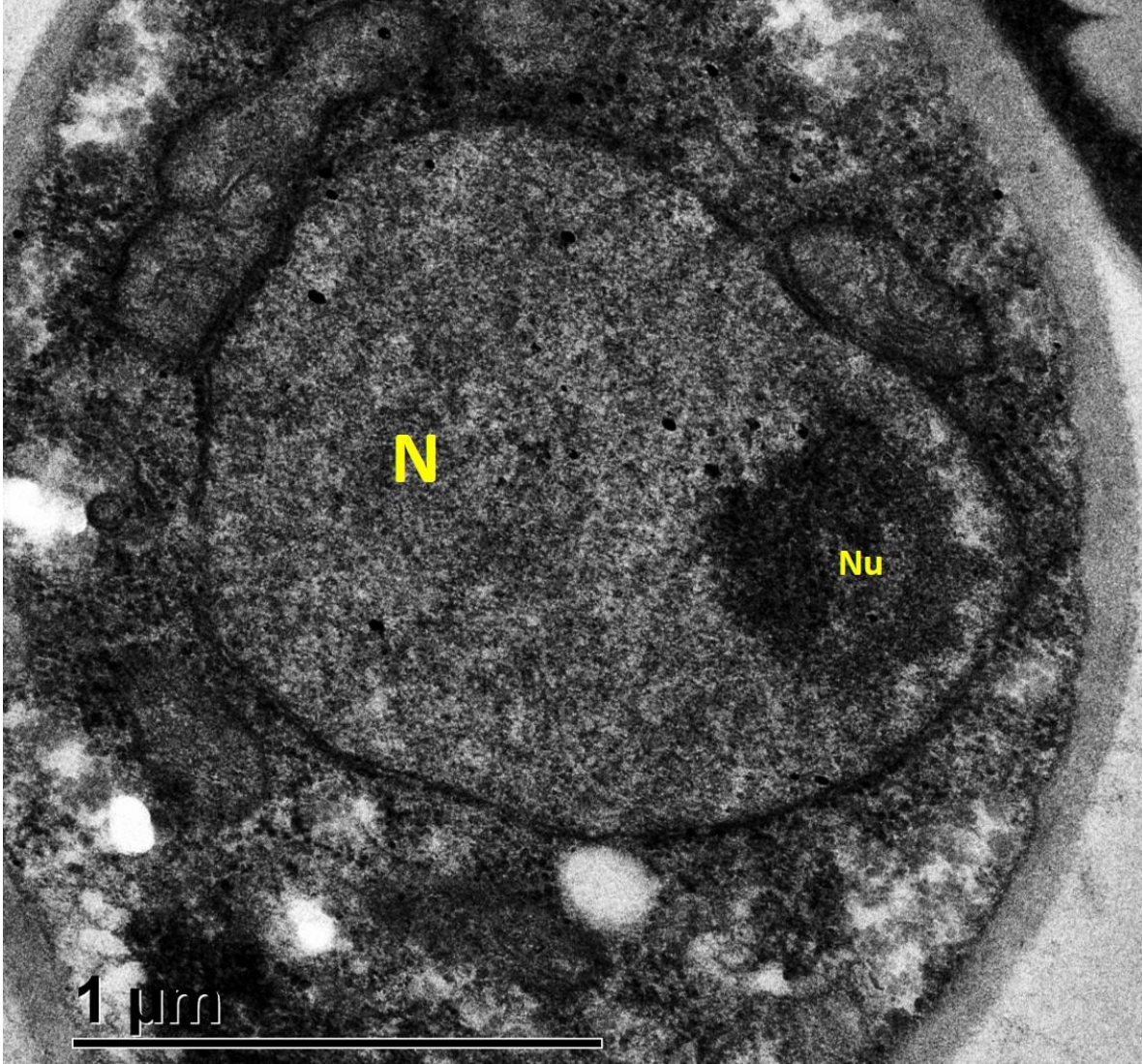


Figura 6. Nucléolo en célula de *U. maydis*. Núcleo (N), Nucléolo (Nu) (Micrografía tomada por O. Said Quiroz Zerecero, 2018).

III. Hipótesis

En los eucariontes la organización nucleolar es muy conservada por lo que se espera que en los hongos basidiomicetos: *Ustilago maydis* y *Pleurotus* sp. los componentes nucleolares estén presentes.

IV. Objetivo general

1. Identificar los componentes ultraestructurales del nucléolo de los basidiomicetos.

Objetivos particulares

1. Identificar el componente fibrilar denso de *Ustilago maydis* y *Pleurotus sp.*
2. Identificar los centros fibrilares de *Ustilago maydis* y *Pleurotus sp.*
3. Identificar el componente granular de *Ustilago maydis* y *Pleurotus sp.*

V. Metodología

El hongo *Ustilago maydis* fue adquirido de una cepa en etapa levaduriforme, por medio de una donación del laboratorio a cargo del Dr. José Ruiz Herrera del departamento de ingeniería genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, mientras que, una cepa de *Pleurotus sp.* fue donada por el Dr. Sigfrido Sierra Galván del laboratorio de micología de la Facultad de Ciencias, UNAM. El material biológico fue procesado para microscopia electrónica de transmisión de la siguiente forma:

Fijación y postfijación

Los tejidos de ambos hongos fueron fijados con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 6% en tubos Eppendorf de 1 mL, al paso de 24 horas se realizaron abundantes lavados con un amortiguador de fosfatos (PBS). Posteriormente, el 50% de los tejidos de cada hongo fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 2 %, donde permanecieron 24 horas.

Inclusión en Epón

Las muestras fueron deshidratadas en etanol a distintas concentraciones (30%,50%,70%,80%,90%,96%). En cada una de las concentraciones las muestras permanecieron 5 minutos. Posteriormente, se colocaron en alcohol absoluto realizando 3 cambios de 15 minutos cada uno. Al finalizar la deshidratación, comenzó la preinclusión donde se formó una mezcla de óxido de propileno con resina en proporción 1:1, en dichas mezclas fueron colocadas las muestras. Al transcurso de 24 horas las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 0.5 mL a

los que se añadió resina. Dichos tubos se colocaron a 60 °C durante 24 horas, para su polimeización.

Corte

Al obtener los polímeros de tejido-resina se realizaron cortes semi-finos de un grosor de 300-350 nm aproximadamente. Dichos cortes fueron contrastados con azul de toluidina. Posteriormente, se delimitó la zona de interés de la cual se obtuvieron cortes ultrafinos, su espesor osciló entre los 40 y 50 nm de acuerdo a su color.

Contraste

Los cortes ultrafinos de alrededor de 40 nm fueron recogidos con rejillas de cobre para microscopia electrónica de transmisión con ayuda de pinzas de relojero. Se aplicó un contraste con acetato de uranilo-citrato de plomo. Después, las rejillas fueron colocadas en cámaras húmedas, donde se les agregó acetato de uranilo al 4% en el que permanecieron 30 minutos, consecutivamente se agregó citrato de plomo al 0.3% durante 10 minutos. Al finalizar, las preparaciones se observaron con un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-1010 trabajando a 80,000 kV y el registro de imágenes se realizó con dos cámaras. Una cámara MTI modelo CCD-300-RC y con otra CCD modelo Gatan Orius SC600.

VI. Resultados

La figura 7 muestra la ultraestructura del núcleo celular haploide de *U. maydis* durante su etapa levaduriforme (Kämper *et al.*, 2006). Dentro del núcleo de *U. maydis* se observó un dominio más electrodensó que el resto del nucleoplasma, que por su morfología fue identificado como nucléolo. En *U. maydis* el nucléolo posee una forma esférica y ocupa aproximadamente una tercera parte del volumen nuclear con base en las imágenes observadas. Se observó que el nucléolo se encuentra cercano a la periferia intranuclear y posee un aspecto fibrogranular (Fig.7A y 7B). En todas las observaciones se presentó un nucléolo por cada núcleo.

Cuando el nucléolo fue observado en cortes longitudinales (Fig.7A) su tamaño fue de 0.86-0.91 μm de diámetro, mientras que, de forma transversal (Fig.7B) el tamaño fue de 0.65-0.7 μm de diámetro.

En el nucléolo de *U.maydis* (Fig. 8) se reconocieron dos elementos nucleolares basados en criterios morfológicos: el componente fibrilar denso y el componente granular. En las observaciones realizadas no fue posible identificar centros fibrilares.

Por otra parte, en *Pleurotus* sp. se observaron células uninucleadas (Fig. 9 y 10), en las cuales se observó al nucléolo. El nucléolo de *Pleurotus* sp. posee una forma esferoidal y ocupa una parte importante del volumen nuclear, lo cual puede observarse en los cortes longitudinales. Al igual que en *U. maydis* el nucléolo de *Pleurotus* sp. fue encontrado en la periferia intranuclear y uno por cada célula. En la figura 9 se puede observar un nucléolo en un corte longitudinal con aspecto principalmente granular y con un tamaño de 0.9 μm de diámetro, mientras que, en la figura 10 es posible observar un nucléolo en un corte transversal con un aspecto fibrogranular y con un tamaño de 0.5 μm . El nucléolo estuvo constituido en todas las ocasiones por CFD y CG. En el nucléolo de *Pleurotus* sp. no se presentaron CF.

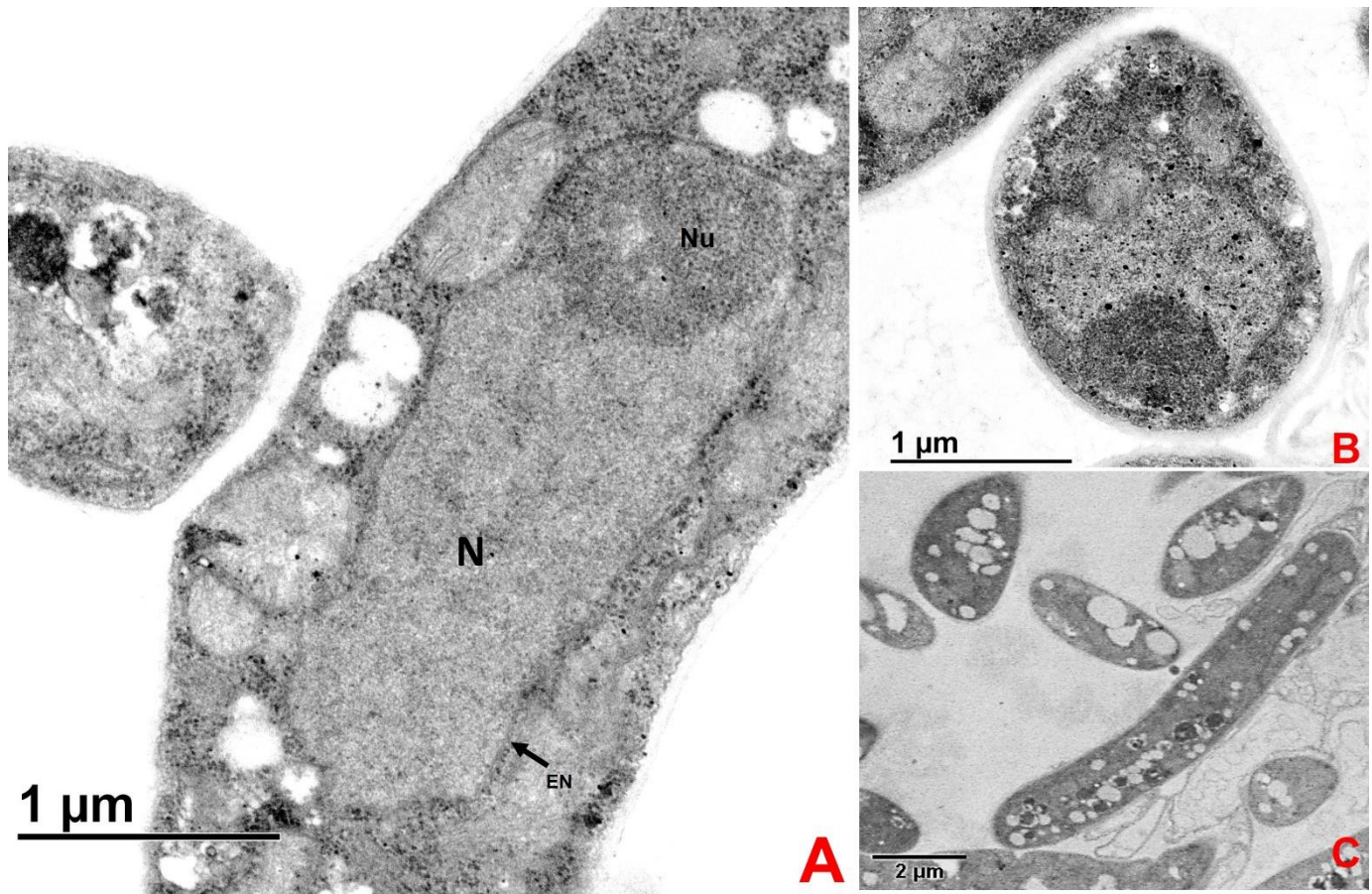


Figura 7. Micrografías electrónicas de *Ustilago maydis*. A. Núcleo celular (N), nucléolo (Nu), y envoltura nuclear (EN). B. Célula observada de forma transversal. C. Célula observada de forma longitudinal. Tomada con cámara CCD modelo Gatan Orius SC600.

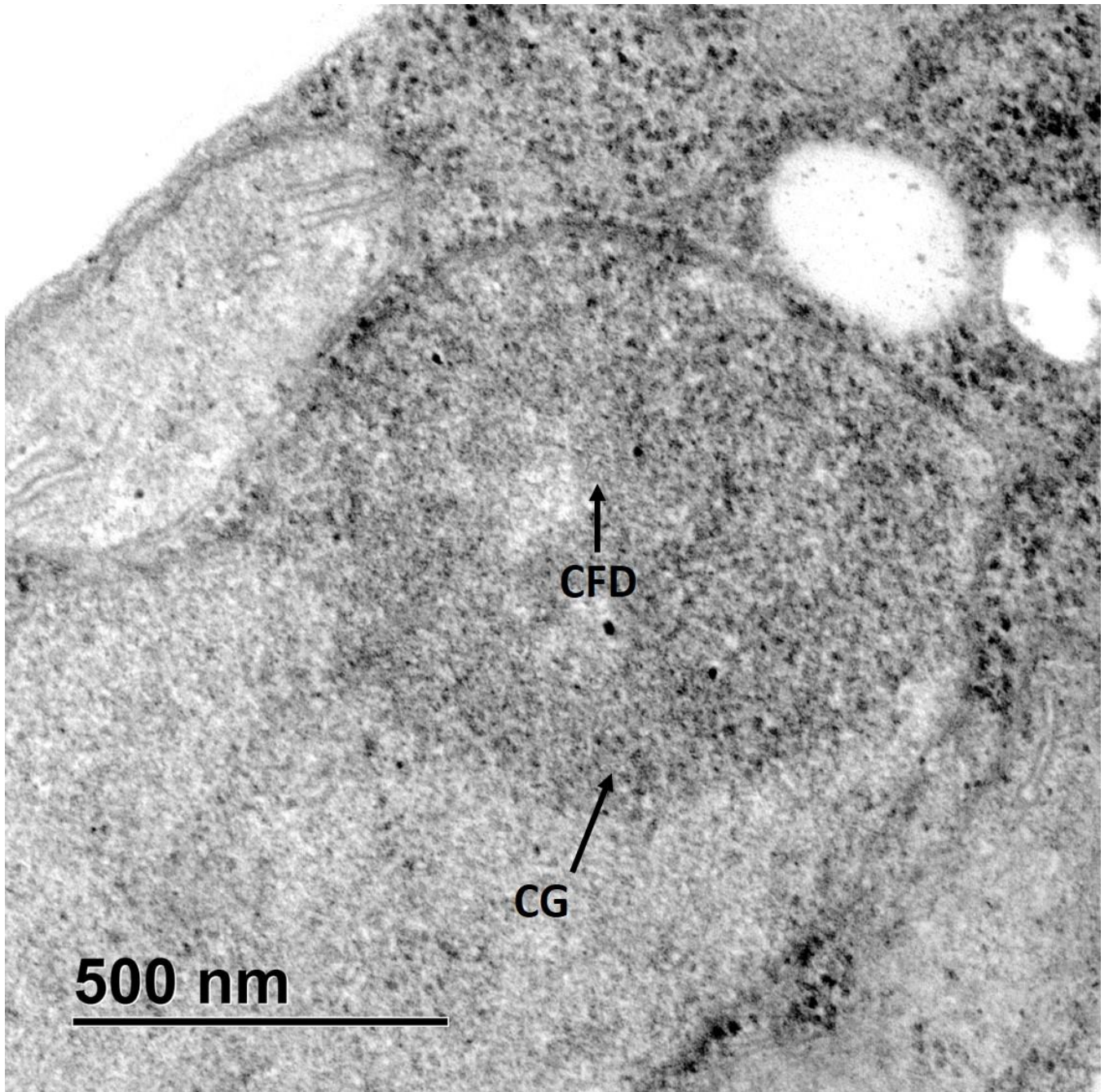


Figura 8. Nucléolo de *Ustilago maydis*. Componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG). Observación realizada mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando contraste uranilo-plomo. Tomada con cámara CCD modelo Gatan Orius SC600.

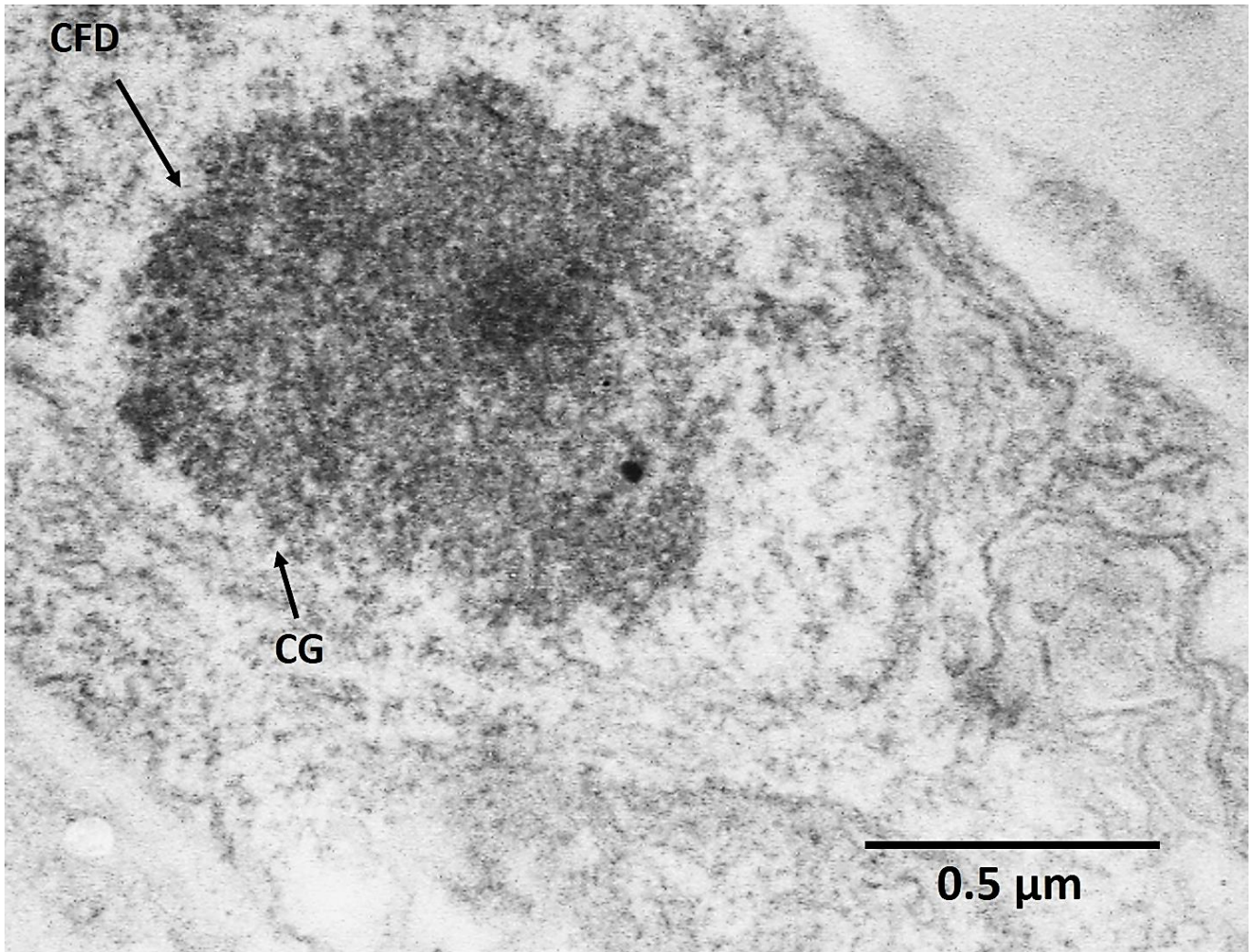


Figura 9. Nucléolo de *Pleurotus* sp. Componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG). Observación longitudinal realizada mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando contraste uranilo-plomo. Tomada con cámara MTI modelo CCD-300-RC.

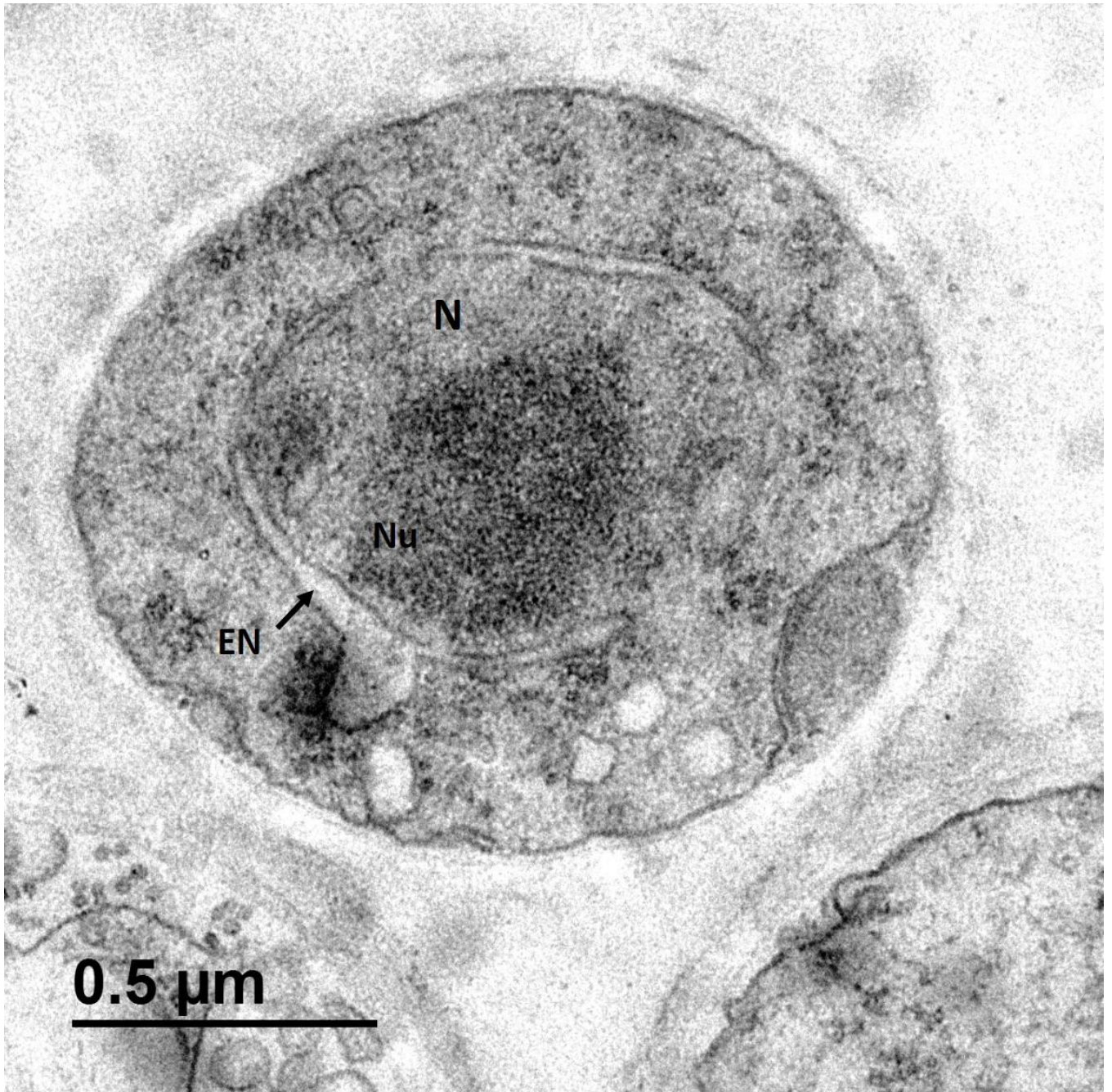


Figura 10. Célula de *Pleurotus* sp. observada de forma transversal. Núcleo celular (N), nucléolo (Nu), envoltura nuclear (EN). Observación realizada mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando contraste uranilo-plomo. Tomada con cámara CCD modelo Gatan Orius SC600.

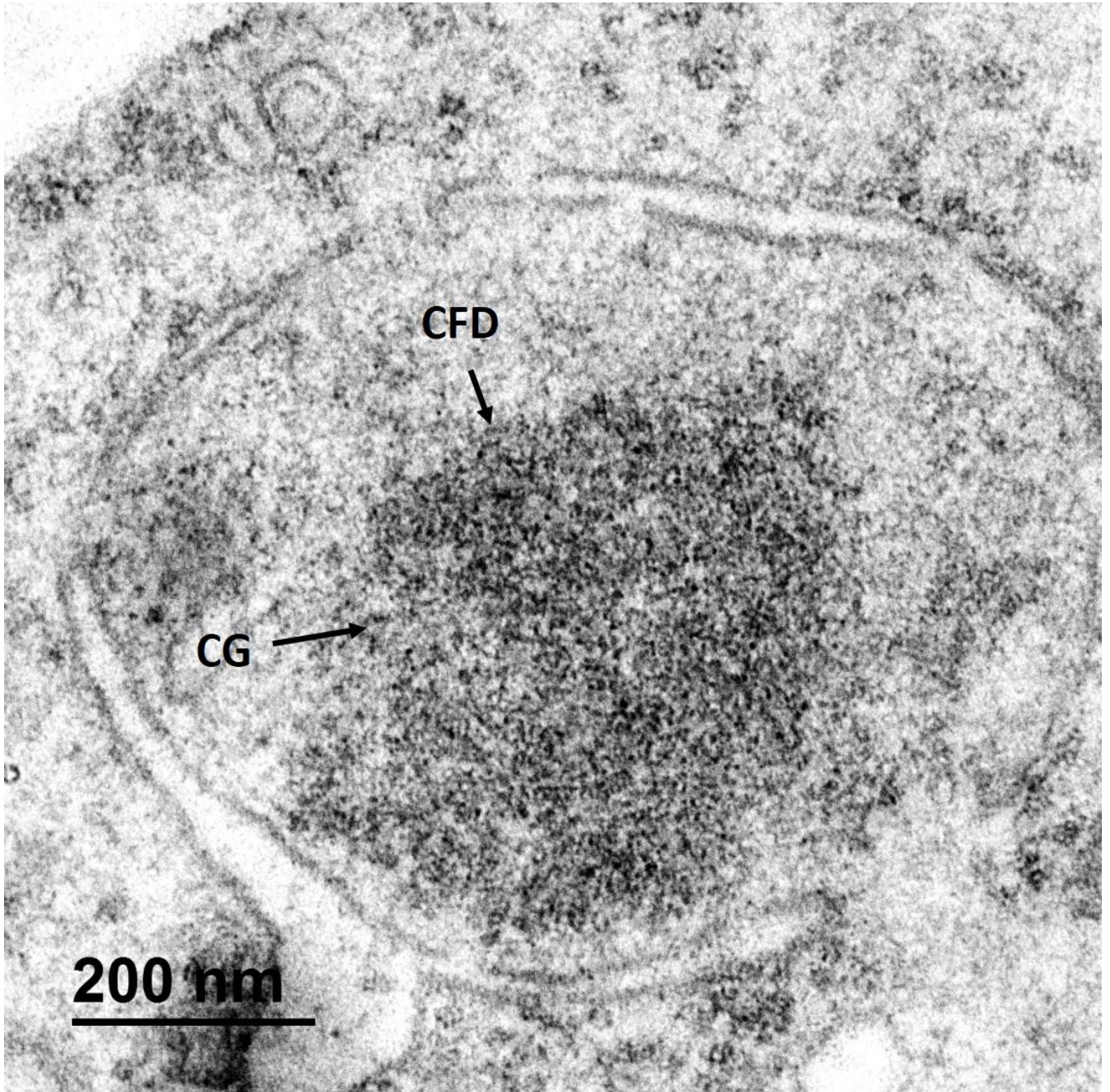


Figura 11. Nucléolo de *Pleurotus* sp. Componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG). Observación realizada mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando contraste uranilo-plomo. Tomada con cámara CCD modelo Gatan Orius SC600.

VII. Discusión

El nucléolo es el dominio más prominente del núcleo interfásico de las células eucariontes y es reconocible por su morfología y tamaño (Boisvert *et al.*, 2007), donde ocurre la biogénesis de los ribosomas; sin embargo, dichas funciones podrían seguir procesos distintos en los diferentes grupos de eucariontes de acuerdo con distintas observaciones ultraestructurales. El nucléolo generalmente está compuesto ultraestructuralmente por componente fibrilar denso, centros fibrilares y componente granular, sin embargo; se ha registrado que en múltiples especies los centros fibrilares no están presentes, como, por ejemplo, en *Drosophila* (Knibiehler *et al.*, 1982). A partir de dichas observaciones Thiry y Lafontaine (2005) han sugerido que en realidad el modelo de estructura tripartita es menos frecuente en los eucariontes que un modelo bipartito constituido de un componente fibrilar y un componente granular, en el cual se agrega a los hongos. Se piensa que esta organización es anterior en la historia evolutiva y que a partir de ella surgió la organización tripartita. El cambio en la compartimentalización de dos a tres elementos nucleolares podría estar relacionada con la cantidad de regiones intergenicas de rDNA. Por otra parte, el estudio del nucléolo en hongos del grupo Dikarya incluyendo al organismo modelo *S. cerevisiae* han brindado información relevante. En nuestros resultados se observan nucléolos con material fibrogranular homogéneo en *U. maydis* y *Pleurotus* sp. donde la presencia de centros fibrilares no es clara y que son morfológicamente similares al nucléolo de *S. cerevisiae*. Trumtel y colaboradores (2000) consideraron que *S. cerevisiae* posee una estructura nucleolar tripartita, sin embargo; la presencia de centros fibrilares ha sido discutida por Thiry y Lafontaine (2005).

Se considera que en la periferia y dentro de los centros fibrilares se encuentra el rDNA transcripcionalmente activo, así como la RNA Pol I por lo que la ausencia de este componente en el nucléolo plantea un cuestionamiento respecto a la localización de dichos elementos (rDNA y RNA Pol I) en los hongos *U. maydis* y *Pleurotus* sp. Una posible explicación es la que sugiere que el nucléolo bipartito está

constituido de un componente fibrilar donde ocurre la síntesis de rRNA y ahí se pueden alojar el rDNA y la RNA Pol I. El componente fibrilar del nucléolo bipartito posee características similares a centros fibrilares y al componente fibrilar denso (Thiry y Lafontaine, 2005; Thiry *et al.*, 2011).

En nuestras observaciones de *U. maydis* (Fig 8) y en los estudios de *S. cerevisiae* (Trumtel *et al.*, 2000) se encontraron pequeños sitios translucidos similares a los intersticios nucleolares, invaginaciones donde suele encontrarse rDNA pero no RNA Pol I ni factores de transcripción. Sin embargo, en *Pleurotus* sp. no se observaron, lo cual no permite reconocer a los intersticios nucleolares como una característica de los basidiomicetos (Thiry y Lafontaine, 2005; Thiry, 1993).

Los resultados de este trabajo son congruentes con los estudios ultraestructurales de *U. maydis* donde el nucléolo fue observado uno por célula, en la periferia intranuclear y sin centros fibrilares (Ramberg y McLaughlin, 1980; O'Donnell y McLaughlin, 1984a; O'Donnell y McLaughlin, 1984b; Snetselaar y Mims, 1993; Snetselaar y Mims, 1994; Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Sin embargo, el tamaño del nucléolo en la etapa levaduriforme fue distinto al reportado por O'Donnell y McLaughlin, (1984b), lo cual puede deberse a la etapa de la interfase en la que se encontraron los nucléolos. En el caso de *Pleurotus* sp. nuestros resultados sugieren que el nucléolo es similar al de *Pleurotus ostreatus* (Yoon y Kim, 1994) y al igual que en *U. maydis* se sugiere realizar estudios más detallados, enfocados a identificar si los centros fibrilares se presentan en estas especies.

Otra posibilidad, es que los resultados obtenidos se deban a etapas fisiológicas. Se han observado nucléolos de gran tamaño carentes de centros fibrilares tras la inhibición de la transcripción del RNA (Smetana *et al.*, 2008). Desde un punto de vista crítico, este trabajo podría ser insuficiente por lo que una posibilidad es abordar el problema por medio de una reconstrucción tridimensional de cortes seriados o con técnicas de contraste específico o preferenciales tal como la de Bernhard para ribonucleoproteínas (López- Velázquez *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que los resultados aquí mostrados son parte de la evidencia que robustece la hipótesis de que todas las células eucariontes poseen

nucléolo y particularmente permite realizar sugerencias respecto al nucléolo de los hongos, específicamente al grupo de los basidiomicetos. Se sugiere que hay un nucléolo por núcleo y que el nucléolo en este grupo se encuentra en la periferia intranuclear, asociada a la envoltura, cómo es posible contrastarlo en distintos estudios ultraestructurales (Mims y Richardson, 2005).

VIII. Conclusiones

1. En *Ustilago maydis* se presenta un nucléolo que se encuentra en la periferia intranuclear y posee una forma ovoide. Su aspecto es fibrogranular.
2. En *Pleurotus* sp. el nucléolo se localiza en la periférica intranuclear y presenta elementos fibrogranulares.

X. Referencias

Bao, D., Ishihara, H., Mori, N., Kitamoto, Y. 2004. Phylogenetic analysis of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) based on restriction fragment length polymorphisms of the 5' portion of 26S rDNA. *Journal of Wood Science*, 50(2): 169-176.

Béatrice, L., y Georgios, Z. 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology*, 141(6): 1479-1490.

Blackwell, M. 2010. Fungal evolution and taxonomy. *BioControl*, 55(1): 7-16.

Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, 98(3): 426-438.

Boisvert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A. 2007. The multifunctional Nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 574-585.

Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M. y Lamond A.I. 2010. The nucleolus under stress. *Molecular cell*, 40(2): 216-227.

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., Kahmann, R. 2009. *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual review of phytopathology*, 47: 423-445.

Carron, C., Balor, S., Delavoie, F., Plisson-Chastang, C., Faubladiet, M., Gleizes, P.E., O'Donohue, M.F. 2012. Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *J Cell Sci*, 125:4532-4542.

Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5): 582-594.

DiMario, P.J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol*, 239: 99-178.

Dundr, M., Misteli T. 2002. Nucleolomics: an inventory of the Nucleolus. *Molecular Cell*, 9: 5-7.

Fontana, F. 1781. Traité sur le venin de la vipere sur les poisons americains sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons végetaux: on y a joint des observations sur la structure primitive du corps animal. Differentes expériences sur la reproduction des nerfs et la description d'un nouveau canal de l'oeil (vol. 1). chez Nyon l'Ainé.

Guadarrama-Mendoza, P. C., Valencia del Toro, G., Ramírez-Carrillo, R., Robles-Martinez, F., Yáñez-Fernández, J., Garín-Aguilar, M. E., Bravo-Villa, G. 2014. Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3): 861-872

Hein, N., Hannan, K.M., George, A.J., Sanij, E., y Hannan, R.D. 2013. The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends in molecular medicine*, 19(11): 643-654.

Heitz, E.1931. Nukleolen und chromosomen in der Gattung *Vicia*. *Planta*, 15: 495-505.

Hernández-Verdun, D. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 2: 189-194.

Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. UNAM-Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 552 p.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K., Lightwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J., Mozley-Strandridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y., Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111: 509-547.

- Holliday, R. 1961. The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res.* 2: 204-230.
- Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. En: Handbook of Genetics, Vol. 1, pp 575-595. Ed. King, R. C. Plenum Press, N.Y.
- Huerta, G., Martínez-Carrera, D., Sánchez, J. E., y Leal-Lara, H. 2009. Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista mexicana de micología*, 30:31-42.
- INDEX FUNGORUM webpage. 2018. Available in: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> Checked in April 2018.
- Jackson, D.A. 2012. The Cell Nucleus: Biogenesis, Structure, and Function. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. En: Meyers, R. A. (Ed.). *Epigenetic regulation and epigenomics*. John Wiley & Sons. 394-445
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A.B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., González-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C.H., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis., Platt, G. Swimmer, M., Gnirke, M., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B.W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444: 97-101.
- Klosterman, S. J., Perlin, M. H., Garcia-Pedrajas, M., Covert, S. F., Gold, S. E. 2007. Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics*, 57: 1-47.
- Knibiehler, B., Mirre, C., Rosset, R. 1982. Nucleolar organizer structure and activity in a nucleolus without fibrillar centres: the nucleolus in an established *Drosophila* cell line. *Journal of cell science*, 57(1): 351-364.
- Lanver D., Müller, A.N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F.B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S.A., Kahmann, R. 2018. The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-seq analysis. *The Plant Cell*, 30(2): 300-323.
- Lanver D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L.S., Schuster M., Tanaka S., Liang L., Ludwig N., Kahmann R. 2017. *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7): 409.

- Lara-Martínez, R., Segura-Valdez M., De La Mora I., López-Velázquez G., Jiménez-García L.F. 2016. Morphological studies of nucleologenesis in *Giardia lamblia*. *The Anatomical Record*, 299: 549-556.
- Larraya, L.M., Pérez, G., Peñas, M. Baars, M., Mikosch, J.J.P., Pisabarro, T.S.P., Ramírez, L. 1999. Molecular Karyotype of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3413-3417.
- Leung, A.K. y Lamond, L.A. 2003. The Dynamics of the Nucleolus. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 13: 39-54.
- Leung, A.K.L., Gerlich, D., Miller, G., Lyon, C., Lam, Y., Lleres, D., Daigle, N., Zomerdijk, J., Ellenberg, J., Lamond, A. 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *The Journal of Cell Biology*, 166: 787-800.
- Lo, S. J., Lee, C. C., Lai, H. J. 2006. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell research*, 16(6): 530.
- López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M. D. L., Jiménez-García, L. F. 2005. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, 11: 293-299.
- Mao, Y. S., Zhang, B., Spector, D. L. 2011. Biogenesis and Function of Nuclear Bodies. *Trends in Genetics: TIG*, 27(8): 295–306.
- Martínez-Carrera, D. 1999. Cultivation of oyster mushrooms. In: Oyster mushrooms. McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology 1999. (Ed. Licker, M. D.). McGraw-Hill, Inc., New York. pp.1-6.
- Matei, A., Ernst, C., Günl, M., Thiele, B., Altmüller, J., Walbot, V., Usadel, B., Doehlemann G. 2018. How to make a tumour: cell type specific dissection of *Ustilago maydis*-induced tumour development in maize leaves. *New Phytologist*. 217(4):1681-1695
- Matei, A. y Doehlemann, G. 2016. Cell biology of corn smut disease *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current opinion in microbiology*, 34: 60-66.
- McClintock, B. 1934. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Cell Tissue. Res.*, 21, 294-326.
- McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Boekhout, T., Oberwinkler, F., Vánky, K., Pennycook, S. R., Begerow, D. 2016. *Mycosarcoma* (Ustilaginaceae), a resurrected generic name for corn smut (*Ustilago maydis*) and its close relatives with hypertrophied, tubular sori. *IMA Fungus*, 7(2), 309-315.
- Mims, C. W., y Richardson, E. A. 2005. Ultrastructure of urediniospore development in *Coleosporium ipomoeae* as revealed by high-pressure freezing followed by freeze substitution. *International Journal of Plant Sciences*, 166(2): 219-225.
- Montgomery, T.H. 1898. Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *J Morphol* 15: 265-582.

- Mosgoeller, W. 2004. Nucleolar Ultrastructure in Vertebrates. En: Olson, M.O.J (ed). The nucleolus. *Landes Biosciences*, Austin, pp.10-20
- Németh A. y Grummt, I. 2018. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Current opinion in cell biology*, 52, 105-111
- Nepomuceno-Mejía, T., Lara-Martínez, R., Hernández, R., Segura-Valdez, M., Jiménez-García, L.F. 2016. Nucleologenesis in *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, 22: 621-629.
- O'Donnell, K.L. y McLaughlin, D.J. 1984a. Ultrastructure of Meiosis in *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 76 (3): 468-485.
- O'Donnell, K.L. y McLaughlin, D.J. 1984b. Postmeiotic Mitosis, Basidiospore, and Septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 76 (3): 486-502.
- Pawlik, A., Janusz, G., Koszerny, J., Małek, W., Rogalski, J. 2012. Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by amplified fragment length polymorphism. *Current microbiology*, 65(4), 438-445.
- Pederson, T. 2011. The Nucleus Introduced. En: Spector, D. L. (eds.) *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5), a000521.
- Rajaratnam, S., Bano, Z., Miles, P.G., 1987. *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 26:157-223.
- Ramberg, J.E. y McLaughlin D.J. 1980. Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany*, 58 (14): 1548-1561.
- Redkar, A., Villajuana-Bonequi, M., Doehlemann, G. 2015. Conservation of the *Ustilago maydis* effector See1 in related smuts. *Plant signaling & behavior*, 10(12), e1086855.
- Ruiz-Herrera, J. 2008. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia*, 1 (1): 118-135.
- Ruiz-Herrera, J., León, C.G., Guevara-Olvera, L., Cárabez-Trejo, A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 141 (3): 695-703.
- Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C., Vera-Nuñez, A., Sánchez-Arreguín, A., Ruiz-Medrano, R., Salgado-Lugo, H., Sánchez-Segura, L., Peña-Cabriales, J. 2015. A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. *New Phytologist*, 207: 769-777.
- Sánchez, J.E. y D.J. Royse. 2017. *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* ECOSUR, México. 352 pp.
- Sánchez-Arreguín, J., Hernández-Oñate, M., León-Ramírez, C., Ruiz-Herrera, J. 2017. Transcriptional analysis of the adaptation of *Ustilago maydis* during growth under nitrogen fixation conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 57: 597-604.

Schwann T. 1839. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen. Sander, Berlin.

Sirri, V., Urcuqui-Inchima, P., Roussel, D., Hernández, V. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry Cell Biol*, 129: 13-31.

Smetana, K. y Busch, H. 1974. The nucleolus and nucleolar DNA. En: "The Cell Nucleus" (Ed.), Academic Press, New York. Vol. 1, pp. 73–147.

Smetana, K., Starková, J., Trka, J. 2008. To the nucleolar density and size in apoptotic human leukemic myeloblasts produced *in vitro* by Trichostatin A. *European journal of histochemistry: EJH*, 52(3), 143.

Snetselaar, K.M. y Mims, C.W. 1993. Infection of Maize Stigmas by *Ustilago maydis*: Light and Electron Microscopy. *Phytopathology*, 83 (8): 843-850.

Snetselaar, K.M. y Mims, C.W. 1994. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research*, 98 (3): 347-355.

Stajich J.E, Berbee, M.L., Blackwell, M., Hibbett, D.S., James, T.Y., Spatafora, J.W., Taylor J.W. 2009. The Fungi. *Current biology: CB*, 19: 840-845.

Staněk, D., y Fox, A. H. 2017. Nuclear bodies: new insights into structure and function. *Current opinion in cell biology*, 46, 94-101.

Steinberg, G. y Pérez-Martin, J. 2008. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology*, 18(2): 61-67.

Stevenson, J. A., y Johnson, A. 1944. The nomenclature of the cereal smut fungi. *Plant Disease Repr.* 28: 663-670.

Taylor, J.W., Spatafora, J., O'Donnell, K., Lutzoni, F., James, T., Hibbett, D.S., Geiser, D., Bruns, T.D., Blackwell, M. 2004. The fungi. En: Cracraft J. y Donoghue M.J. (eds.). *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press, Oxford, pp. 171-196.

Thiry M., Lamaye, F., Lafontaine, D.L. 2011. The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus*, 2(4), 289-293.

Thiry, M. 1993. Ultrastructural distribution of DNA and RNA within the nucleolus of human Sertoli cells as seen by molecular immunocytochemistry. *Journal of cell science*, 105(1): 33-39.

Thiry, M. y Lafontaine D.L. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in cell biology*, 15(4), 194-199.

Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulières, F., Gas, N. 2000. Assembly and Functional Organization of the Nucleolus: Ultrastructural Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Mutants. *Molecular Biology of the Cell*, 11(6): 2175-2189.

Tsekrekou, M., Stratigi, K., Chatzinikolaou, G. 2017. The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *International journal of molecular sciences*, 18(7): 1411.

Valentin, G. 1836. Repertorium für Anatomie und Physiologie 1: 1-293 Verlag von Veit und Comp; Berlin.

Valentin, G. 1839. Repertorium für Anatomie und Physiologie 4: 1-275 Verlag von Veit und Comp; Berlin.

Wagner, R. 1835. Einige Bemerkungen und Fragen über das Keimbläschen (vesicular germinativa). *Müller's Archiv Anat Physiol Wissenschaft Med*, 268, 373-377.

Yoon, K.S., y Kim, Y.S. 1994. Ultrastructure of mitosis and clamp formation in the somatic hyphae of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*, 593-601.