

Edda Hurtado  
Santiago

Relación de la síntesis de trehalosa y el factor de transcripción Yap1 en el  
proceso infeccioso y respuesta a estrés de *Ustilago maydis*

2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Relación de la síntesis de trehalosa y el factor  
de transcripción Yap1 en el proceso infeccioso y  
respuesta a estrés de *Ustilago maydis*

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

EDDA HURTADO SANTIAGO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

MARZO, 2019



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias Biológicas

**Relación de la síntesis de trehalosa y el factor de transcripción Yap1 en el proceso infectivo y respuesta a estrés de *Ustilago maydis*.**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Biol. Edda Hurtado Santiago

**Dirigido por:**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

**SINODALES**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Presidente

  
Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal  
Secretario

Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo  
Vocal

Esquivel Naranjo Edgardo U.  
Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime  
Suplente

  
Firma

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández  
Suplente

  
Firma

  
Dra. Juana Elizabeth Elton Puente  
Directora de la Facultad

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia  
Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Marzo, 2019

*“Nunca hemos pretendido haber alcanzado la cima de nuestro saber ni de nuestra capacidad, y ahora, como antes, estamos dispuestos a reconocer las imperfecciones de nuestro conocimiento, añadir a él nuevos elementos e introducir en nuestros métodos todas aquellas modificaciones que puedan significar un progreso”.*

**Sigmund Freud**

*“No hay metas definitivas para el conocimiento; el progreso del conocimiento no es más que una diferenciación de los planteamientos”.*

**Hermann Hesse**

## RESUMEN

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque de los microorganismos patógenos. Algunos de ellos son las especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente peróxidos ( $H_2O_2$ ) y superóxidos ( $O_2^-$ ), estas pueden llegar a dañar a todas las biomoléculas e incluso causar la muerte celular. Sin embargo en *U. maydis*, Yap1 es un factor de transcripción encargado de activar genes que codifican proteínas con función antioxidante y así contrarrestan el efecto del estrés oxidativo. Por otra parte, la trehalosa que es un disacárido no reductor, se produce en varios organismos con excepción de los vertebrados, la cual se acumula para la protección y estabilización de la membrana celular ante diversas situaciones de estrés. En este trabajo, obtuvimos las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , mediante cruces de las cepas mutantes  $\Delta tps2$  ( $a_1b_1$ ) y  $\Delta yap1$  ( $a_2b_2$ ) en plantas de maíz, más adelante se desarrollaron los tumores y la progenie (teliosporas) fue recuperada para ser analizada. Las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  fueron seleccionadas en medio completo, suplementado con higromicina B ( $200 \mu g \cdot mL^{-1}$ ) y carboxina ( $1 \mu g \cdot mL^{-1}$ ). El genotipo de cada una de las cepas fue verificado mediante PCR. Analizamos la respuesta de las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , caracterizamos el fenotipo, evaluamos el grado de virulencia y la expresión de genes relacionados con la protección al daño oxidativo, tales como el *Um01947* (citocromo-c-peroxidasa) y *Um02153* (alquilhidroperóxido reductasa) durante el proceso infectivo. Con estos resultados, proponemos que existe una relación entre la trehalosa y el factor de transcripción Yap1 durante la respuesta a estrés y la patogenicidad.

**Palabras clave:** *U. maydis*, ROS, Yap1, *TPS2*, estrés.

## ABSTRACT

In response to the microbe or pathogen invasion, plants produce toxic Reactive Oxygen Species (ROS), mainly peroxide ( $H_2O_2$ ) and superoxide anions ( $O_2^-$ ), which damage all biomolecules and eventually produce cell death, including the pathogen and the plant cell. Nevertheless, transcription factor Yap1 in *U. maydis* is the principal activator of genes related to oxidative stress response showing antioxidant activity. On the other hand, trehalose is a non-reducing disaccharide of glucose, it can be synthesized by bacteria, archaea, plants, fungi and invertebrates. It is considered a carbon source and a protecting agent against abiotic environmental challenges and biotic stresses. It is well known, *U. maydis*  $\Delta yap1$  mutants, are impaired in the response to  $H_2O_2$  and virulence. In this work, we constructed the double mutants  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , by plant inoculation of mutants  $\Delta tps2$  ( $a_1b_1$ )  $\times$   $\Delta yap1$  ( $a_2b_2$ ). After tumors were developed in plant tissue, we recovered them and the progeny (teliospores) was analyzed. The double mutants  $\Delta tps2::\Delta yap1$  were selected on complete media supplemented with  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hygromycin B and  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  carboxine. Correct genotype was verified by PCR in those strains selected. We have analyzed the genotype of the double mutants in response to oxidative stress, pathogenicity and the expression of genes related to oxidative protection, such as cytochrome-C-peroxidase (*Um01947*) and alkyl hydroperoxide reductase (*Um02153*). This data will lead us to propose the relationship between trehalose and Yap1 during the response to stress and pathogenicity.

**Key words:** *Ustilago maydis*, ROS, YAP1, TPS2, stress response.

## DEDICATORIA

*A mis padres Ángeles y Erasto  
A mí hijo Ángel Jaziel  
A mí Dios*

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por el apoyo al proyecto de investigación de ciencia básica CB-2011-01/165844, “Análisis de la función de la trehalosa y la metacaspasa Mac1 en la respuesta a estrés y la muerte celular en *Ustilago maydis*”, desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Molecular, Unidad de Microbiología Básica y Aplicada de la Facultad de Ciencias Naturales.

Nuevamente al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por el apoyo brindado al número de becario 778741.

Agradezco al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por todo el apoyo brindado y su grandiosa paciencia.

Se agradece a la M. en C. Georgina Berenice Cueva Torres en el Laboratorio de Cromatografía del LAN-PlanTECC, CINVESTAV-Irapuato.

Se agradece al Dr. Fausto Arellano Carbajal por abrirme la puerta del Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva, Facultad de Ciencias Naturales en donde me permitió utilizar el microscopio de fluorescencia.

A mis sinodales el Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, al Dr. Fidel Landeros Jaime, al Dr. Fausto Arellano Carbajal y a la M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández, por todo su apoyo y consejos.

A todos mis maestros de inglés y alemán de la Facultad de Lenguas y Letras, por todos los consejos, sugerencias y estrategias de aprendizaje.

A mi hijo, Ángel Jaziel, que es mi fuerza, mi voluntad, mi amor y mi todo. A mis padres, Ángeles y Erasto por todo el apoyo económico y emocional que me han

brindado. A mis hermanos Eliut y Edna, por cuidar a mi niño como si fuera suyo y por ser mis guías.

A mis compañeros y amigos del laboratorio (Eve, Alonso, Cecy, Anaí, Víctor, Nami y los que me falten) gracias a todos por hacer esos días de trabajo mucho más amenos y agradables.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>REVISIÓN DE LA LITERATURA</b> .....	17
<b>Modelo de estudio <i>Ustilago maydis</i></b> .....	17
<b>Ciclo de vida de <i>U. maydis</i></b> .....	17
Trehalosa .....	20
Síntesis de la trehalosa .....	21
Regulación del metabolismo de la trehalosa en <i>S. cerevisiae</i> .....	23
Mecanismo protector de la trehalosa en hongos patógenos.....	23
Impacto de la trehalosa en hongos patógenos de humanos.....	25
El papel de la trehalosa en basidiomicetos .....	26
Fitopatógenos y su relación con la trehalosa .....	26
Especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	27
Factor de transcripción Yap1 .....	29
La familia de proteínas Yap.....	30
Yap1 como regulador principal de la ráfaga oxidativa .....	31
Localización subcelular y activación de Yap1 .....	31
Función de Yap1 en hongos fitopatógenos.....	32
Función de Yap1 en hongos patógenos de humanos.....	33
Proteínas detoxificadoras de ROS .....	33
<b>HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	36
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	36
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
Secuencias.....	37
Modelado por homología de la proteína Yap1 .....	37
Análisis <i>in silico</i> de los promotores .....	37
Cepas, medio de cultivo y condiciones de crecimiento.....	38
Manipulación de ácidos nucleicos.....	38
Extracción de ADN .....	38

Amplificación de ADN.....	39
Extracción de ARN.....	41
Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	42
RT-PCR.....	42
Análisis de la expresión de <i>UmTPS2</i> en $\Delta yap1$ .....	43
Análisis de la expresión de <i>UmYAP1</i> en la mutante incapaz de sintetizar trehalosa .....	44
Análisis de la expresión de <i>Um01947</i> y <i>Um02153</i> durante la infección en plantas de maíz.....	44
Extracción de trehalosa.....	45
Reacción fuz.....	46
Germinación de teliosporas.....	46
Análisis fenotípico .....	47
Ensayos de estrés <i>in vitro</i> .....	47
Crecimiento en forma de hifa .....	48
Pruebas de patogenicidad en plantas de maíz .....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	51
En <i>U. maydis</i> la familia Yap está compuesta sólo por la proteína Yap1.....	51
Identificación <i>in silico</i> de sitios de reconocimiento de Yap1 en los promotores de los genes <i>TPS1</i> , <i>TPS2</i> , <i>YAP1</i> , <i>Um01947</i> y <i>Um02153</i> .....	51
Modelo por homología de la proteína Yap1 .....	53
Generación de las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$ .....	56
Identificación molecular de las dobles mutantes.....	59
Análisis fenotípico .....	62
Las cepas dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$ son altamente sensibles al estrés oxidativo .....	63
El estrés osmótico no altera el crecimiento de las mutantes $\Delta yap1$ .....	66
El estrés de pared celular afecta la sensibilidad en las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$ .....	67
La participación de Yap1 junto con la trehalosa es esencial para la tolerancia a la radiación por luz UV y pH ácido .....	69

El crecimiento en las cepas $\Delta tps2$ y $\Delta tps2::\Delta yap1$ es favorecido en estrés salino	70
<i>UmYAP1</i> y <i>UmTPS2</i> no son esenciales para tolerar la presencia de metales pesados	71
Yap1 regula la expresión de <i>UmTPS2</i>	74
La expresión de <i>YAP1</i> aumenta en las mutantes $\Delta tps2$ en respuesta al estrés osmótico y oxidativo	75
Las mutantes $\Delta yap1$ acumulan menor cantidad de trehalosa en estrés osmótico y oxidativo	76
La transición dimórfica de <i>U. maydis</i> se ve afectada en las mutantes $\Delta tps2$	77
La función de Yap1 y Tps2 es indispensable para la virulencia en <i>U. maydis</i>	79
Participación de <i>Um01947</i> y <i>Um02153</i> en el proceso infeccioso de <i>U. maydis</i>	80
Citocromo-c-peroxidasa <i>Um01947</i>	81
Alquil-hidroperóxido reductasa <i>Um02153</i>	84
<b>DISCUSIÓN</b>	87
En <i>U. maydis</i> Yap1 es una proteína única	87
Modelo por homología de la proteína Yap1	88
Regulación transcripcional de la síntesis de trehalosa por medio de Yap1	89
Las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$ son altamente sensibles al estrés oxidativo	90
Las mutantes $\Delta yap1$ acumulan menor cantidad de trehalosa en estrés osmótico y oxidativo	92
La tolerancia al estrés osmótico y salino se atribuye a <i>TPS2</i>	93
<i>UmYAP1</i> y <i>UmTPS2</i> no son esenciales para tolerar la presencia de metales pesados	95
La ausencia de trehalosa y de Yap1 afecta la virulencia en <i>U. maydis</i>	95
<b>CONCLUSIONES</b>	98
<b>PERSPECTIVAS</b>	99
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	100
<b>APÉNDICE</b>	115

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cepas de <i>U. maydis</i> utilizadas en este trabajo. ....	38
Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados.....	40
Tabla 3. Especificación de los amplicones.....	41
Tabla 4. Condiciones de estrés en placa para <i>U. maydis</i> .....	48
Tabla 5. Secuencias y sitios de unión del factor Yap1.....	53
Tabla 6. Sensibilidad relativa de cepas de <i>U. maydis</i> ante diferentes condiciones de estrés.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> .....	20
Figura 2. Estructura de la trehalosa. ....	21
Figura 3. Ruta de la biosíntesis de trehalosa en hongos. ....	22
Figura 4. Estructura “abierta” o “inactiva” de la proteína Yap1 de <i>U. maydis</i> . ....	55
Figura 5. Estructura “cerrada” o “activa” de la proteína Yap1 de <i>U. maydis</i> .....	56
Figura 6. Pruebas de apareamiento mediante reacción fuz.....	58
Figura 7. Identificación de la mutación $\Delta yap1$ por PCR.....	60
Figura 8. Inserción del cassette que sustituye al gen <i>YAP1</i> por <i>HPH</i> por doble recombinación homóloga .....	60
Figura 9. Inserción del cassette que sustituye al gen <i>YAP1</i> por <i>HPH</i> .....	61
Figura 10. Inserción del cassette que sustituye a <i>TPS2</i> por el gen que confiere resistencia a carboxina. ....	61
Figura 11. Inserción del cassette que sustituye a <i>TPS2</i> por el gen que confiere resistencia a carboxina. ....	62
Figura 12. Crecimiento en condiciones estándar sobre MM7 sin agente estresante. ....	63
Figura 13. Respuesta a estrés oxidativo. Crecimiento sobre MM7 suplementado con $H_2O_2$ y menadiona.....	65
Figura 14. Respuesta a estrés oxidativo. Crecimiento sobre MM7 suplementado con <i>tert</i> -butilhidroperóxido.....	65
Figura 15. Respuesta a estrés oxidativo. Crecimiento sobre MM7 suplementado con Rosa Bengala expuesto a luz y oscuridad. ....	66
Figura 16. Respuesta a estrés osmótico. Crecimiento sobre MM7 suplementado con NaCl y KCl.....	67
Figura 17. Respuesta a estrés de pared celular. Crecimiento sobre MM7 suplementado con agentes rojo congo y SDS.....	69
Figura 18. Respuesta a estrés de pared celular y ácido acético. Crecimiento sobre MM7 suplementado con agentes cafeína .....	69

Figura 19. Daño por radiación UV y ácido acético. Crecimiento sobre MM7 con exposición a luz UV y ácido acético.....	70
Figura 20. Respuesta a estrés salino. Crecimiento sobre MM7 suplementado con LiCl. ....	71
Figura 21. Respuesta a estrés por presencia de metales pesados. Crecimiento sobre MM7 suplementado con CoCl <sub>2</sub> .....	72
Figura 22. Respuesta a estrés por presencia de metales pesados. Crecimiento sobre MM7 suplementado con agentes CdSO <sub>4</sub> y CdCl <sub>2</sub> .....	73
Figura 23. Expresión de <i>UmTPS2</i> en las cepas silvestres FB2 y mutantes $\Delta yap1$	75
Figura 24. Expresión de <i>YAP1</i> en las mutantes $\Delta tps2$ .....	76
Figura 25. Cuantificación de la concentración de trehalosa en la cepa silvestre FB2 y la mutante $\Delta yap1$ .....	77
Figura 26. Dimorfismo <i>in vitro</i> de <i>U. maydis</i> .....	78
Figura 27. Análisis de los signos producidos por las diferentes cruzas de las cepas de <i>U. maydis</i> .....	80
Figura 28. Expresión de <i>Um01947</i> (Citocromo-c-peroxidasa) en plantas infectadas a las 16 hrs pi.....	82
Figura 29. Expresión de <i>Um01947</i> (Citocromo-c-peroxidasa) en plantas infectadas a los 2 dpi.....	83
Figura 30. Expresión de <i>Um01947</i> (Citocromo-c-peroxidasa) en plantas infectadas a los 6 dpi.....	84
Figura 31. Expresión de <i>Um02153</i> (Alquil-hidroperóxido reductasa) en plantas infectadas a las 16 hrs pi .....	85
Figura 32. Expresión de <i>Um02153</i> (Alquil-hidroperóxido reductasa) en plantas infectadas a los 2 dpi .....	85
Figura 33. Expresión de <i>Um02153</i> (Alquil-hidroperóxido reductasa) en plantas infectadas a los 6 dpi .....	86
Figura 34. Esquema hipotético de la relación del factor de transcripción Yap1 con la trehalosa.....	91

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es una de entre varias plantas domesticadas en Mesoamérica, ha sido uno de los recursos básicos de alimentación de los pueblos mesoamericanos. Su presencia en la cultura y la dieta se ha incrementado con el tiempo (Vargas, 2013). El hongo *Ustilago maydis* es un fitopatógeno biotrofo que causa tumores en la planta del maíz (Brefort, 2014). Es dimórfico, crece en forma de levadura que se caracteriza por ser haploide y además saprobio sin embargo, su crecimiento como hifa es dicariótico y es la forma infectiva para el maíz (Matei & Doehlemann, 2016). Las enfermedades generadas en las plantas por los hongos son de las más eminentes amenazas para la agricultura (Djamei & Kahmann, 2012; Dean *et al.*, 2012). En este sentido todos los organismos vivos tienen mecanismos que les permiten sobrevivir ante cambios o situaciones adversas (Botts *et al.*, 2014). Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque de los microorganismos patógenos. Algunos de ellos son las “Especies Reactivas de Oxígeno” (ROS, por sus siglas en inglés), principalmente peróxidos ( $H_2O_2$ ) y superóxidos ( $O_2^-$ ) (Guo *et al.*, 2011). Estos son producidos por las enzimas NADPH oxidasas y las peroxidasas apoplásticas Clase III (Hemetsberger *et al.*, 2015), localizadas en la membrana plasmática de la célula hospedera (Briones *et al.*, 2013). Las ROS pueden dañar todas las biomoléculas e incluso causar la muerte celular (Imley, 2003). Sin embargo, para mantener la homeostasis en la célula, este mecanismo es contrarrestado por medio de dos mecanismos de defensa; 1) enzimático [catalasas, superóxido dismutasas (SODs) y peroxidasas] y 2) no enzimático [glutatiión] (Briones *et al.*, 2013). Cabe mencionar que Yap1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia “Basic Leucine Zipper” (bZIP, por sus siglas en inglés), el cuál se encarga de activar genes que codifican proteínas con función antioxidante (Zhang *et al.*, 2016). Por otra parte, la trehalosa es un disacárido no reductor, se produce en varios organismos con excepción de los vertebrados. Se acumula para la protección y estabilización de la membrana celular, ante diversas situaciones de estrés. Algunos genes involucrados en el

metabolismo de la trehalosa son regulados por los “Elementos de Respuesta a Estrés” (STRE, por sus siglas en inglés) localizados en su región promotora. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, Yap1 tiene un papel muy importante, puesto que regula la expresión de componentes en la activación de la maquinaria de los genes de respuesta a estrés (Elsztein *et al.*, 2011). Yap1 de *U. maydis* funciona como un reductor que es activado de manera intramolecular, por la formación de puentes disulfuro. Las mutantes  $\Delta yap1$  siguen desarrollando el filamento dicariótico y la formación de apresorio (Molina & Kahmman, 2007). Sin embargo, en presencia del peróxido producido por la planta, la virulencia está severamente atenuada. Las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis*, que no producen trehalosa son incapaces de responder a diferentes situaciones de estrés *in vitro*, tal como el estrés oxidativo, osmótico, daño a la pared celular y salino (Cervantes *et al.*, 2016). Así mismo, los ensayos en la planta del maíz muestran que las mutantes  $\Delta tps2$  están afectadas en el establecimiento de la enfermedad. En este trabajo, generamos las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , se caracterizó el fenotipo *in vitro* ante las condiciones de estrés oxidativo, osmótico, daño en la pared celular, salino y por la presencia de metales pesados. En estos ensayos, se observó mayor sensibilidad por parte de las dobles mutantes, en contraste con las cepas silvestres y las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$ , respectivamente. Así mismo, se realizaron ensayos de patogenicidad en las plantas del maíz, observamos que las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  están severamente afectadas en la virulencia, puesto que los resultados de las infecciones indican menor cantidad de tumores aéreos generados de igual manera disminuye la mortalidad y de manera general los síntomas son menores respecto a los producidos por la infección generada por las cepas silvestres FB1xFB2. Encontramos que, en la cepa silvestre, la trehalosa se acumula ante la condición de 0.5 M NaCl, mientras que en ausencia del gen *YAP1* ante la misma condición, disminuye la concentración de trehalosa contenida. Por otra parte, cuando las cepas con ausencia del gen *YAP1* son sometidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye significativamente la concentración de trehalosa, respecto a la cepa silvestre. Lo cual nos indica que la participación del gen *YAP1* regula la síntesis de trehalosa.

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

### **Modelo de estudio *Ustilago maydis***

El hongo *U. maydis* es un organismo eucariota con la siguiente clasificación, Reino: Fungi, Subreino: Dikarya, Fila: Basidiomycota, Subfila: Basidiomycotina, Clase: Ustilaginomicetes, Orden: Ustilaginales, Familia: Ustilaginaceae y Género: *Ustilago*. El grupo de los Ustilaginales, constituye un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y más de 1200 especies, que afectan a más de 4000 plantas monocotiledóneas en todo el mundo (Ruiz-Herrera, 2008). *U. maydis* es un excelente modelo de estudio que se ha establecido para abordar el proceso de la patogenicidad en plantas, debido a su facilidad de manejo, su corto ciclo de vida y que es posible su análisis mediante métodos de genética clásica y molecular (Ruiz-Herrera, 2008; Vollmeister *et al.*, 2012). Este es un hongo que establece una interacción biotrófica y parasita a la planta del maíz (*Zea mays*). Causa la enfermedad específica en el maíz y de su antecesor el teozintle, del Náhuatl “teocintli”, que significa “grano de los dioses” (Ruiz-Herrera, 2008). Éste conduce a la formación de tumores en todos los órganos aéreos de la planta (Brefort *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2015; Redkar *et al.*, 2017). La infección de *U. maydis*, inicia por la penetración directa de la epidermis de la planta y depende del tejido vivo de la misma (Hemetsberger *et al.*, 2012). Así mismo, también es conocido popularmente como “Huitlacoche o cuitlacoche”, cuyo origen de la palabra proviene del Náhuatl (Juárez-Montiel *et al.*, 2011). El “Huitlacoche”, forma parte importante de la cultura culinaria característica de los pueblos mesoamericanos.

### **Ciclo de vida de *U. maydis***

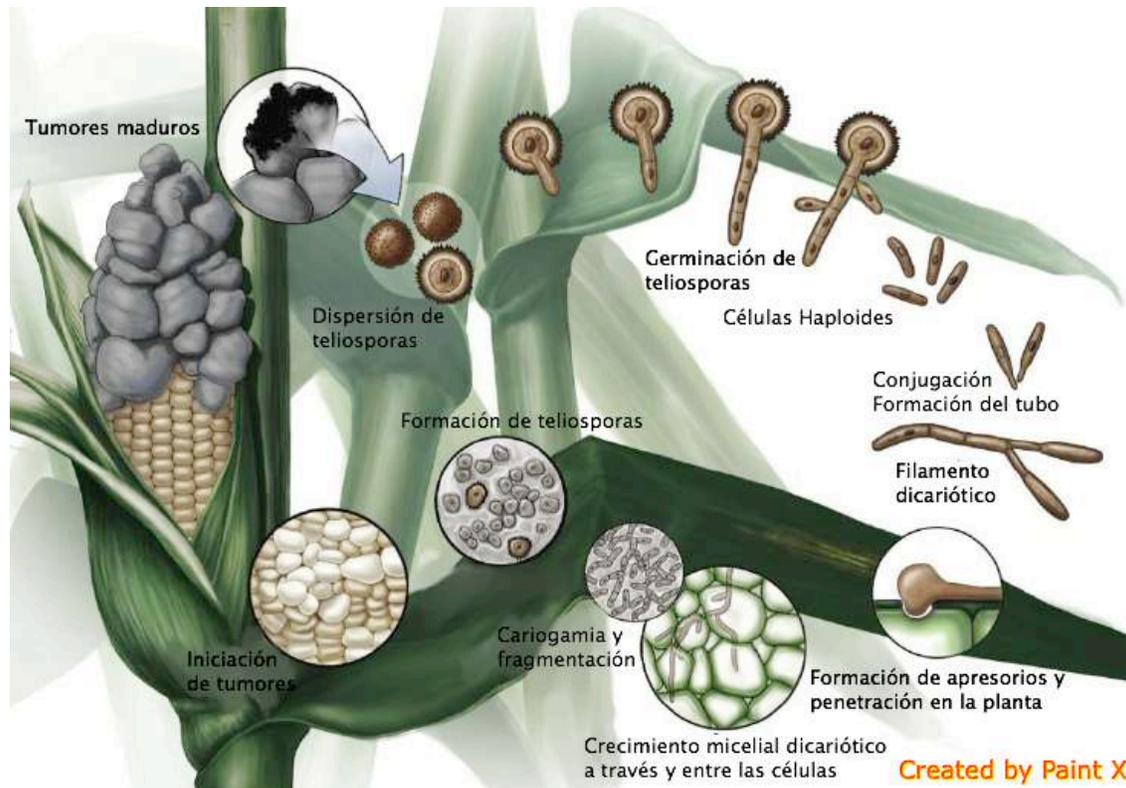
El ciclo de vida de *U. maydis* presenta dos fases de crecimiento, una haploide (n) que se caracteriza por crecer en forma de levaduras de 12-18µm de largo y 4-5µm de ancho y una fase diploide (2n) con morfología de hifa la cuál es dicariótica, que se presenta de manera natural cuando el hongo se encuentra en la

planta hospedera y existen dos cepas sexualmente compatibles (Ruíz-Herrera & León-Ramírez, 2012).

Es importante indicar la participación de los loci **a** y **b**, así mismo destacar que posee un tipo de apareamiento tetrapolar (Vollmeister *et al.*, 2012). Para que éste se lleve a cabo, se requiere de la unión de dos cepas que sean sexualmente compatibles. El locus **a**, es responsable de la fusión celular y del apareamiento. Los dos alelos del locus **a** ( $a_1$  y  $a_2$ , llamados idiomorfos) difieren entre sí en el tamaño y la secuencia del ADN, el primero con 4.5 kpb mientras que el segundo con 8 kpb (Bölker *et al.*, 1992; Ruíz-Herrera, 2008). Cada idiomorfo  $a_1$  y  $a_2$ , contiene dos marcos de lectura abierto (ORF, "Open Reading Frame", por sus siglas en inglés). El primero, se denomina *MFA* [ $mfa1$  ( $a_1$ ) y  $mfa2$  ( $a_2$ )] que codifica los precursores de las feromonas, en otras palabras, las hormonas de *U. maydis*, ambas son polipéptidos de 40 y 38 aminoácidos respectivamente. El segundo, se denomina *PRA* [ $pra1$  ( $a_1$ ) y  $pra2$  ( $a_2$ )], es un polipéptido de 357 y 346 aminoácidos respectivamente. Éste codifica los receptores de la feromona producida por el sexo opuesto (Farfaring *et al.*, 2005; Ruíz-Herrera, 2008). Una vez que se unen las células sexualmente compatibles ocurre la activación autocrina que da inicio al apareamiento. Caso contrario, el locus **b** es denominado multialélico puesto que se han reportado la presencia de idiomorfos desde  $b_1$ - $b_{25}$  (Saville *et al.*, 2012). Este locus codifica para las proteínas *bE* y *bW*, de 410 y 626 aminoácidos respectivamente, que cuando provienen de diferentes *loci* éstas interactúan y forman un heterodímero que constituye un factor de transcripción, cuya función es vital para regular la expresión de genes relacionados con la patogenicidad (Ruíz-Herrera & León-Ramírez, 2012).

Retomando el inicio del ciclo de vida, tenemos la fase saprofítica en la cual el hongo crece en forma de levaduras haploides alargadas que se reproducen por gemación o también llamadas esporidias. Dicha gema aparece en la zona de máxima curvatura formándose un ángulo de 30° a 45° con respecto a la célula madre. La siguiente fase es la micelial y patogénica, la única forma infecciosa del hongo, durante la cual crece en forma de hifas dicarióticas que sólo se desarrollan en el interior del huésped. Este proceso se inicia con el apareamiento de dos

células que contengan dos *loci* de apareamiento sexuales compatibles **a** y **b** (ej.  $a_1b_1 \times a_2b_2$ ). La cercanía de células compatibles provoca la inhibición de la gemación y la formación de filamentos delgados o tubos de conjugación que se dirigen uno hacia el otro por una acción quimiotrópica, para finalmente fusionarse en el extremo apical para formar el micelio dicariótico infeccioso, el cual continua su crecimiento y es capaz de invadir a un huésped susceptible a través de aberturas naturales, ya sea por los estomas, por los órganos florales o formando un apresorio. Se sugiere que los estigmas son la ruta más importante de infección, ya que los tumores presentes en las mazorcas son los más prominentes (Lanver *et al.*, 2017; Thompson & Raizada, 2018) (Figura 1). Sin embargo, para que *U. maydis* genere la infección y cause daño en la planta, una vez fusionadas las células haploides, que forman un dicarion, éste comienza a crecer y desarrollar el promicelio o hifa, por lo que se requiere tener contacto directo con la pared celular de la planta hospedadora. La mayor parte del crecimiento ocurre en los tejidos meristemáticos de ésta, con la formación final de las agallas o tumores en los cuales ocurre la esporulación del hongo (Lanver *et al.*, 2017). Las hifas adquieren formas irregulares y se fragmentan, cubriéndose finalmente con una pared gruesa, equinulada y pigmentada. En esta fase ocurre la citocinesis con la formación del estado diploide del hongo. Las esporas maduras (teliosporas) son liberadas cuando las agallas se secan y se abren. Las teliosporas constituyen el estado diploide del hongo. Todo esto provoca anomalías morfológicas durante el crecimiento y desarrollo de la planta, presentando clorosis, antocianinas, tumores en los órganos aéreos de la planta y el fruto (mazorca), que representan los signos de la enfermedad. La germinación de la teliospora se inicia con la formación de un tubo germinativo denominado promicelio. El núcleo de la espora migra hacia el promicelio y es aquí en donde ocurre la meiosis. A partir del promicelio se forman cuatro basidiosporas en forma acropétala las cuales geman para reiniciar el ciclo de vida (Brefort *et al.*, 2009; Ruíz-Herrera & León-Ramírez, 2012).

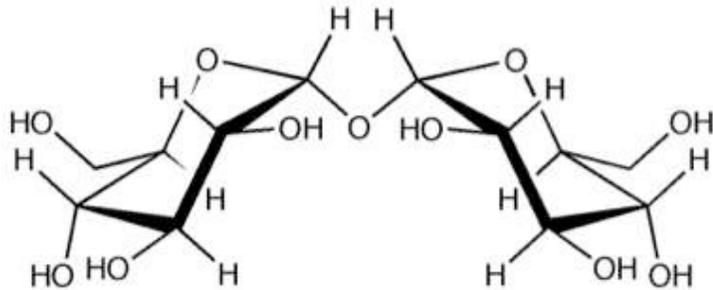


**Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Ustilago maydis*.** Se muestra la dispersión de teliosporas a partir de un tumor maduro, éstas germinan con la formación del promicelio y cuatro basidiosporas. Éstas se desprenden y se multiplican en forma de levadura. En seguida se presenta la conjugación de dos esporidias sexualmente compatibles para formar el filamento dicariótico que invade a la planta y crece en forma de micelio, dando lugar a los tumores en el cual se forman las teliosporas que posteriormente germinan fuera de la planta y nuevamente inicia el ciclo de vida. (Tomada y modificada de Saville *et al.*, 2012).

## Trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor, requiere de dos hexosas para su síntesis, está compuesta por dos moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa unidas en una configuración  $\alpha,\alpha$ -1,1 (Figura 2) (Schwarz & Van Dijk, 2016). Es sintetizada por varios organismos como las bacterias, arqueas, plantas, hongos e invertebrados, pero no en vertebrados (Elbein, 2003). La función y síntesis de la trehalosa ha sido extensivamente estudiada en *Saccharomyces cerevisiae*, en la que originalmente se describió como un carbohidrato de reserva similar del glucógeno presente en otro tipo de organismos (Voit, 2003). Hoy en día, se sabe que la trehalosa es

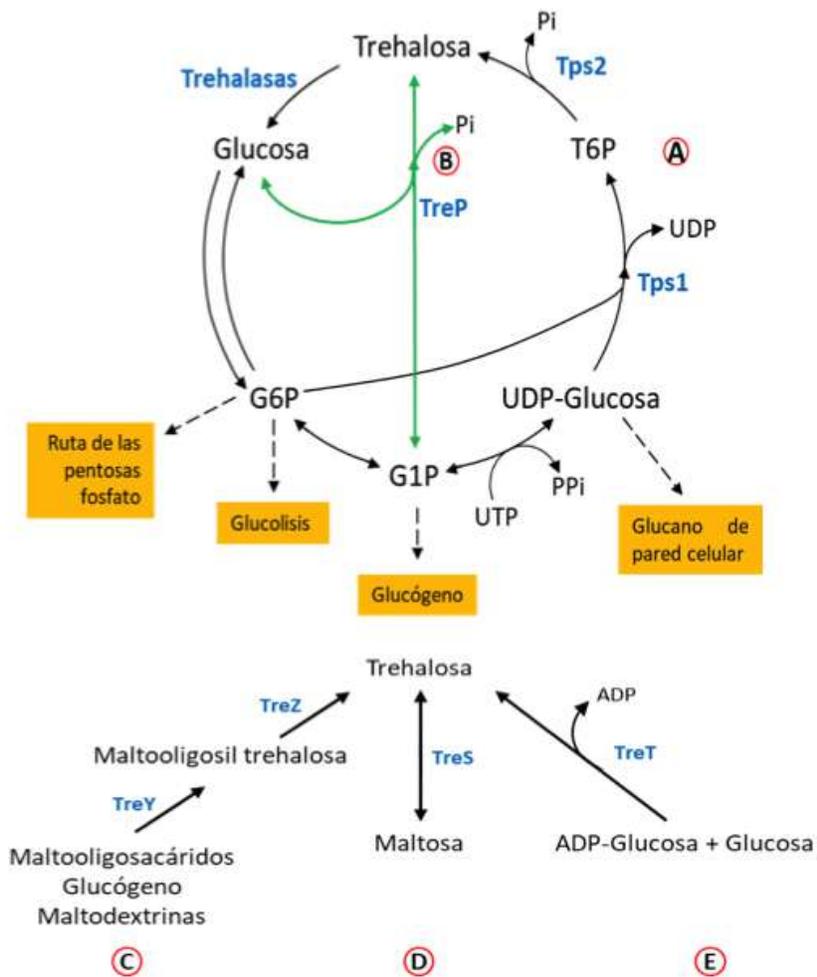
acumulada para la protección y la estabilización de la membrana celular, ante diversas situaciones de estrés, como lo es el incremento de la temperatura, presión hidrostática, desecación, inanición, estrés oxidativo y osmótico, así como la exposición a agentes químicos tóxicos (Crowe, 2007; Iordachescu & Imai, 2011).



**Figura 2. Estructura de la trehalosa** ( $\alpha$ -D-glucopiranosil  $\alpha$ -D-glucopiranosido). (Imagen tomada de Elbein *et al.*, 2003).

### Síntesis de la trehalosa

Se han descrito cinco rutas de síntesis de la trehalosa. De las cuales tres se presentan en bacterias y las otras dos en organismos eucariotas. La ruta TPS/TPP (denominada OstA y OstB en bacterias), es la más conservada en los tres dominios en el árbol de la vida. La trehalosa se forma por la acción de la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS/OstA) que sintetiza trehalosa-6-fosfato (T6P, por sus siglas en inglés) a partir de la glucosa y de la glucosa-6-fosfato. La trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPS/OstB) subsecuentemente desfosforila la T6P a trehalosa (Figura 3) (Schwarz & Van Dijck, 2016). Esta ruta de síntesis de trehalosa, involucra el complejo enzimático denominado trehalosa-fosfato sintasa/trehalosa-fosfato fosfatasa (vía TPS/TPP) descrita inicialmente en *S. cerevisiae* (Gancedo & Flores, 2004). La producción de trehalosa está relacionada con la supervivencia y la patogenicidad, en el caso de algunos hongos (Lowe, 2009). Por su condición de molécula protectora ha sido sujeto de estudio principal en hongos patógenos de humanos (Schwarz & Van Dijck, 2016).



**Figura 3. Ruta de la biosíntesis de trehalosa en hongos.** A) La vía Tps1/Tps2 (TPS/TPP) consiste de dos enzimas principales: la trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2). B) La ruta alterna para la síntesis de trehalosa (TreP) consiste de la enzima trehalosa fosforilasa que convierte reversiblemente glucosa y glucosa-1-fosfato (G1P) en trehalosa y fosfato inorgánico (Pi). C) La ruta TreY/TreZ consiste de la enzima maltoligosil trehalosa sintasa (TreY) y la maltoligosil trehalosa trehalohidrolasa (TreZ). TreY convierte maltoligosacáridos, glicógeno y almidón (maltodextrina) en maltoligosil trehalosa y TreZ libera trehalosa de maltoligosil trehalosa. D) La trehalosa sintasa (TreS) cambia maltosa directamente en trehalosa. E) El ADP-glucosa y la glucosa son reversiblemente convertidas en trehalosa por la transferencia de trehalosa glicosil sintasa (TreT) (Tomada y modificada de Thammahong *et al.*, 2017).

## **Regulación del metabolismo de la trehalosa en *S. cerevisiae***

La regulación metabólica de la trehalosa en *S. cerevisiae* se encuentra bajo tres diferentes condiciones del organismo (Eleutherio *et al.*, 2014). La primera consiste en condiciones normales, es decir, sin presencia de ningún tipo de estrés, por lo que el organismo no sintetiza trehalosa. En donde el complejo TPS, no es funcional y lo lleva a bajos niveles de la actividad de Tps1. En la segunda es bajo condiciones de estrés, donde *TSL1* es inducido y activa el complejo TPS (Trevisol *et al.*, 2014). La expresión de *NTH1* es también inducida en presencia de estrés. La trehalasa neutra no es fosforilada y por lo tanto no está activa, lo que permite que por un tiempo se acumule la trehalosa. Una parte de la trehalosa debe ser transportada y se lleva a cabo por Agt1 (da Costa Morato Nery *et al.*, 2008).

La bicapa lipídica es protegida por la trehalosa. Ath1 está involucrada en la movilización exógena de la trehalosa. La tercera condición es durante la recuperación de la célula causado por el estrés, en donde ya no se requiere de la trehalosa, por lo que es necesario que se degrade. La trehalosa es hidrolizada por las trehalasas Nth1 y Ath1, en dos moléculas de glucosa, para que pueda entrar a la célula y ésta se recupere (Eleutherio *et al.*, 2014). De acuerdo al análisis *in silico* se han encontrado en la base de datos de *U. maydis* (<http://www.genome.jgi.doe.gov>) (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>), los genes que codifican para las trehalasas neutra Nth1 (*Um11661*) y la trehalasa ácida Ath1 (*Um02212*) (Tesis López-Cabrera, 2016).

## **Mecanismo protector de la trehalosa en hongos patógenos**

En hongos, la trehalosa está presente en las esporas, cuerpos fructíferos y en las células vegetativas como las hifas (Elbein, 2003). Dentro de las propiedades bioquímicas de la trehalosa propuestas por Colaço & Roser en 1995, la trehalosa incluye el reemplazamiento del agua, la cristalización y la estabilidad química. En cuanto al reemplazo del agua, la trehalosa forma cuatro enlaces de hidrógeno con dos moléculas de agua. También se ha propuesto que la trehalosa forma enlaces de hidrogeno con proteínas y al interactuar con las cabezas polares de fosfolípidos, mantienen la estructura de la membrana bajo condiciones de

deshidratación (Thammahong *et al.*, 2017). En cuanto a la cristalización, debido a que no retiene moléculas de agua, no forma cristales como lo hacen otros azúcares. Esto permite que la trehalosa sea estable a altas temperaturas y bajo condiciones de desecación. Finalmente, la trehalosa es más resistente a hidrólisis en comparación con otros disacáridos, esto le confiere mayor estabilidad (Thammahong *et al.*, 2017).

En el caso de los hongos filamentosos y levaduriformes, la trehalosa actúa como molécula protectora ante diversas situaciones de estrés, como la desecación, estrés térmico (frío y calor), osmótico y oxidativo. Así mismo, está relacionada con funciones para la supervivencia y la patogenicidad. Tiene una relación directa con la capacidad infectiva tanto en hongos patógenos de plantas como de humanos (Roetzer *et al.*, 2008; Lowe, 2009; Thammahong *et al.*, 2017). La presencia de la trehalosa es importante para el crecimiento filamentosos de los hongos, la supervivencia de los conidios y la germinación, todo esto debido a su función como fuente de carbono, sobre todo en condiciones severas de estrés (Thammahong *et al.*, 2017).

Se ha visto que, en situaciones de estrés térmico en el caso de *S. cerevisiae* después de haber sido expuesta durante 1 hora a 40° C, la cantidad de trehalosa se incrementó. En el caso de hongos patógenos de humano, como en *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus nidulans* la temperatura influye en la supervivencia de éstos patógenos. Así mismo, también se ha propuesto la hipótesis de que la trehalosa puede llegar a prevenir la desnaturalización de las proteínas en condiciones de estrés por frío y así mantener intacta la membrana celular (Elbein *et al.*, 2003). De igual manera en condiciones de estrés, como el calor, la trehalosa funciona como una chaperona química, en donde se une a las proteínas para prevenir su desnaturalización (Zähringer *et al.*, 2000). Por otra parte, la trehalosa tiene una participación muy importante en la eliminación de los radicales libres que se producen bajo condiciones de estrés oxidativo y protege a la membrana en las lesiones generadas por éste (Benaroudj *et al.*, 2001; Bleonca *et al.*, 2013). Se considera incluso que actúa como un antioxidante, en donde es capaz de reducir la

carbonilación de las proteínas durante la exposición de las células de las levaduras al estrés causado por peróxidos ( $H_2O_2$ ) y superóxidos ( $O_2^-$ ) (Eleutherio *et al.*, 2014).

### **Impacto de la trehalosa en hongos patógenos de humanos**

*Aspergillus fumigatus* es un hongo patógeno oportunista del humano de mucha importancia, infecta principalmente los pulmones de pacientes que se encuentran inmunocomprometidos. Causando una neumonía progresiva, posteriormente se disemina hacia el corazón, cerebro y otros órganos. Se ha publicado que las mutantes deficientes de trehalosa ( $\Delta tpsA/B$ ) son sensibles al choque térmico y se ha sugerido que disminuye significativamente la viabilidad a los 50°C. Sin embargo, en condiciones normales de temperatura del cuerpo humano, la pérdida de TpsA y TpsB en *A. fumigatus* no afectó la viabilidad (Al-Bader *et al.*, 2010; Thammahong *et al.*, 2017).

Las especies del género *Candida* son los agentes más frecuentemente implicados en infecciones invasivas en humanos causadas por hongos, que generan altas tasas de mortalidad (Tortorano *et al.*, 2004). En el caso de *C. albicans* es el agente causante más común de las infecciones invasivas causadas por el género, con una tasa de mortalidad por encima del 50% (Tortorano *et al.*, 2004; Diezmann, 2014). Este hongo, presenta tres diferentes morfologías en su ciclo de vida, las cuales son; 1) levadura, 2) pseudohifa e 3) hifa (Berman, 2006). La virulencia, depende en gran medida de la plasticidad morfogenética, en el que al dimorfismo se le considera un factor determinante para la virulencia (Serneels *et al.*, 2012). Se sabe que *C. albicans* es más invasiva en forma de hifa que en la morfología de levadura (Mayer *et al.*, 2013). La participación de la trehalosa tiene lugar en la determinación de propiedades de la superficie celular, en el que en ausencia del gen *CaTPS2* presenta cambios en el crecimiento del hongo en la formación de hifa y por ende se ve reflejado en la virulencia, además de que no produce trehalosa (Zaragoza *et al.*, 2002). En este sentido, también se han incrementado el número de infecciones atribuidas a otras especies de *Candida*, como es el caso de *C. glabrata*, que de igual manera es un hongo patógeno

oportunista de humanos. Particularmente las infecciones generadas por esta especie han mostrado dificultad en el tratamiento, debido a la alta resistencia que ha tenido con los agentes antifúngicos. Se sabe que esta especie, únicamente es capaz de asimilar dos tipos de moléculas de azúcar, la glucosa y la trehalosa (Zilli *et al.*, 2015).

### **El papel de la trehalosa en basidiomicetos**

*Cryptococcus neoformans* es un patógeno oportunista de humanos con dos mecanismos posibles de infección, ya sea la forma de levadura o la forma de espora. Este patógeno, puede introducirse a través del sistema respiratorio y prolifera dentro de los pulmones. En el caso de *C. neoformans* la trehalosa es requerida para la resistencia al estrés oxidativo. Así mismo, el metabolismo de la trehalosa tiene importancia en la transición de levadura a hifa, la cual es de suma importancia para la virulencia de este hongo (Botts *et al.*, 2014). Se ha visto que en la delección de los genes tanto *TPS1* como los de las trehalasas, resulta en severos daños en la esporulación, lo cual es crítico para la supervivencia del organismo y como consecuencia se ve afectada la virulencia (Petzold *et al.*, 2006; Botts *et al.*, 2014). Otro hongo basidiomiceto de gran importancia es *Cryptococcus gattii*, es conocido principalmente por generar enfermedad en pacientes inmunocompetentes y en animales. En este sentido *C. gattii* y *C. neoformans* están altamente conectados y conservan la misma ruta metabólica de la trehalosa. En el cual se ha identificado en *C. gattii* que la ruta de síntesis de la trehalosa se encarga de controlar ampliamente la virulencia (Ngamskulrunroj *et al.*, 2009).

### **Fitopatógenos y su relación con la trehalosa**

*Fusarium verticillioides* es un hongo filamentoso y patógeno de plantas que causa pudrición en las espigas y en el tallo de la planta del maíz, puede también llegar a infectar el grano. Se ha observado que en las cepas mutantes *TPS1*, que en su ausencia interfiere con la biosíntesis de trehalosa, no sólo afecta el crecimiento del hongo, sino que también se ve afectada la capacidad de producir fumonisina que es una micotoxina y es considerada un factor de patogenicidad,

indispensable para producir la enfermedad en la planta del maíz. Esto sugiere que la ruta metabólica de la trehalosa en *F. verticillioides* es clave para el control de la pudrición del maíz y la contaminación con micotoxinas (Boudreau *et al.*, 2013).

En el caso de *Magnaporthe grisea* hongo fitopatógeno que causa daño en los cultivos de arroz, la síntesis de la trehalosa es iniciada por el gen *TPS1*. Foster *et al.*, 2003, observó que se requiere de la presencia de trehalosa para la producción de apresorios funcionales e infección primaria de la planta de arroz. Lo que les indicó que la participación del gen *TPS1* es indispensable para la penetración de la cutícula en la planta por medio del apresorio. Además, en conidios de *M. grisea* se acumula gran cantidad de trehalosa durante el proceso infectivo en la planta. Y observaron que en las mutantes afectadas en el gen *TPS1* que no producen trehalosa a niveles similares a los de la cepa silvestre, no son virulentas, lo que destaca la importancia de este disacárido en la funcionalidad del apresorio y por ende del proceso de patogenicidad (Foster *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2007).

Otro hongo interesante es *Botrytis cinerea*, es un patógeno que afecta a más de 230 especies de plantas, también conocido comúnmente como moho gris, la trehalosa no participa directamente en la patogenicidad; sin embargo, ésta molécula sí regula varias funciones fisiológicas como lo son: el crecimiento, la osmoprotección y la regulación ante situaciones de estrés. La trehalosa participa en la protección ante el estrés por calor, al igual que en la supervivencia de los conidios (esporas). En cuanto a la germinación de conidios, el metabolismo de la trehalosa interviene en dos aspectos: 1) proporciona una fuente importante de energía cuando los nutrientes externos se encuentran limitados, y 2) el precursor de la trehalosa T6P, desempeña el papel de regulación de flujo glucolítico (Doehlemann *et al.*, 2006).

### **Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Todos los organismos con un tipo de vida aeróbico generan durante el metabolismo, moléculas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), consideradas como productos tóxicos (Kuang-Ren, 2012).

En este sentido, uno de los principales mecanismos de defensa por parte de la planta, es la denominada ráfaga oxidativa, como pueden ser los peróxidos ( $H_2O_2$ ), aniones superóxidos ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilos (OH) y radicales hidroperóxilos ( $HO_2$ ) (Lehmann *et al.*, 2015). Las ROS son señales moleculares generadas por diferentes complejos enzimáticos y no enzimáticos, que están relacionados con mecanismos de defensa en la interacción planta-patógeno (Camejo *et al.*, 2016). Éstas generan disturbios en la célula, alterando el balance homeostático. Pueden reaccionar con el ADN, lípidos y proteínas, lo cual puede generar daño a los nucleótidos y proteínas o la peroxidación lipídica llevando a la célula al envejecimiento y por ende a la muerte celular (Pei-Ling *et al.*, 2017). Existe evidencia que apoya la acción de diversos complejos enzimáticos involucrados en la producción de las ROS, tal como las NADPH oxidasas (NOX, por sus siglas en inglés), peroxidasas de Clase III, oxalato oxidasas, amino oxidasas, lipoxigenasas y quinona reductasa (Nanda *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2012; Camejo *et al.*, 2016). Así mismo, las ROS también son producidas continuamente por diferentes vías, localizadas en diferentes compartimentos celulares de la planta, tal como los cloroplastos, la mitocondria y los peroxisomas (Gill & Tuteja, 2012).

La generación del peróxido en las plantas, es inducido a causa de factores tanto abióticos como bióticos. Los cuales incluyen las temperaturas extremas, radiación ultravioleta, exposición al ozono, fitohormonas como ABA, deshidratación, metales pesados, salinidad, sequía, estrés hídrico, daños en la planta y la presencia de patógenos (Gill & Tuteja, 2012; Neil *et al.*, 2002). En las relaciones simbióticas y patogénicas, la producción de las ROS es detectada en etapas tempranas de la interacción planta-microorganismo y es fundamental e importante durante la misma (Nanda *et al.*, 2010; Pei-Ling *et al.*, 2017). A causa de la irrupción del patógeno, las ROS son acumuladas específicamente en el sitio de la invasión y al ser tóxicas éstas pueden llegar a matar directamente al patógeno (Guo *et al.*, 2011). Las concentraciones bajas de las ROS activan la adaptación, mediante la expresión de genes, los cuales detoxifican y controlan el daño causado. Mientras que las concentraciones altas de las ROS detienen el ciclo celular e incluso causan la muerte celular mediante apoptosis (Diezmann, 2014).

Las ROS tienen diferentes propiedades biológicas, entre las cuales se incluyen la reactividad química que presentan, la vida media y la solubilidad lipídica. Estos factores influyen de tal forma que OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reaccionen de distinta manera, mostrando cada uno preferencia por distintos tipos de moléculas. Por ejemplo, los residuos de cisteína o metionina son altamente reactivos con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferencia del O<sub>2</sub><sup>-</sup> que muestra mayor preferencia hacia las agrupaciones que contienen Hierro o Azufre (Fe-S) (D'Autréaux & Toledano, 2007). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> para generar radicales hidroxilo tóxicos, mediante dos vías, ya sea con la reacción de Haber-Weiss o con la reacción de Fenton por medio de iones metálicos como por ejemplo el Fe<sup>+</sup> (Kuang-Ren, 2012). Se sabe que el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) puede penetrar las membranas biológicas a través de los canales de aniones, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece cruzar libremente (Lushchak, 2011). De esta manera, por las propiedades químicas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las acuaporinas facilitan la entrada de éste en la célula (Diezmann, 2014).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es un ácido débil de naturaleza dipolar que unifica actividades oxidantes y reductoras. Asimismo, es una de las moléculas quirales naturales más pequeñas, que se origina durante la reducción parcial de oxígeno causada por la luz (fotoexcitación), radiación, hierro ferroso o enzimas (Diezmann, 2014). También se sabe que dependiendo del “ataque” oxidativo, se programan distintas respuestas transcripcionales; las cuáles conducen a la adaptación o protección y eventualmente a la restauración del balance homeostático (Diezmann, 2014). No obstante, los organismos tienen mecanismos que les permiten incrementar la tolerancia al estrés oxidativo, mediante dos vías principalmente. La primera es alterando la permeabilidad de las membranas celulares ante la presencia de las especies reactivas. La segunda es mediante la sobrerregulación de antioxidantes y enzimas relacionadas (Lushchak, 2011).

### **Factor de transcripción Yap1**

Los microorganismos, poseen moléculas que detectan concentraciones muy bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). La proteína Yap1, pertenece a la familia “Basic Leucine Zipper Domain” (bZIP, por sus siglas en inglés), la cual

se caracteriza por ser factores de transcripción. Las proteínas Yap1 son altamente conservadas en las células eucariotas y son miembros de un grupo inespecífico de activadores transcripcionales, involucrados particularmente en genes de respuesta a diversas señales (Lushchak, 2011). Yap1 fue caracterizado a partir de la hipersensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al *tert*-butilhidroperóxido en las mutantes de *S. cerevisiae* (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). Esta proteína regula una gran variedad y compleja expresión de factores antioxidantes tanto enzimáticos como no-enzimáticos que se encargan de: 1) la detoxificación de las ROS; 2) de reducir la tasa de producción de las ROS; así como de 3) reparar los daños generados en las macromoléculas (Ribeiro *et al.*, 2015).

### **La familia de proteínas Yap**

En *S. cerevisiae* existen al menos ocho proteínas Yap (desde Yap1p hasta Yap8p) (Lushchak, 2011; Merhej *et al.*, 2016). Estas proteínas muestran ligeras diferencias pero la propiedad de unión al ADN en sitios específicos es muy similar. Pueden participar en la regulación de la respuesta celular a situaciones de estrés, agentes citotóxicos, iones de metales pesados, pero la función entre ellas puede diferir (Lushchak, 2011). La participación de la familia Yap es en su mayoría en respuesta a diferentes tipos de estrés. Específicamente en *S. cerevisiae*, Yap1p es el regulador principal del estrés oxidativo, Yap2p en respuesta a estrés generado por la presencia de cadmio, Yap4p y Yap6p están asociados a la respuesta a estrés osmótico, nuevamente Yap1p en conjunto con Yap5p están involucrados en el metabolismo de algunos metales, como el hierro, para la detoxificación de arsénico existe una participación en conjunto de Yap1p con Yap8p, por otra parte las funciones de Yap3p y Yap7p aún no identificadas (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).

Por otra parte, en el caso de *C. glabrata* y *C. albicans*, también se han identificado otras proteínas que pertenecen a la familia Yap, con sus excepciones, como en *C. glabrata* sólo se han identificado hasta Yap7, pero también en este organismo existe una variación en Yap3, en donde existen dos tipos, Yap3a y Yap3b (Merhej *et al.*, 2016). En el caso de *U. maydis* se cuenta con una sola

proteína Yap1, que quizás podría cubrir las funciones que son realizadas por las demás proteínas Yap en *Saccharomyces* o en *Candida*. En el caso de la levadura *S. cerevisiae*, la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, está directamente relacionada con una sola vía, a través de Yap1. Sin embargo, en el caso de *S. pombe*, levadura altamente cercana a *S. cerevisiae* cuenta con dos diferentes rutas paralelas en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La primera consiste en la ruta Pap1 (homóloga de Yap1), y otra que consiste en una proteína kinasa que es activada por estrés, Sty1. En este sentido, Pap1, responde rápidamente a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes en la célula, pero su activación es retrasada cuando las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementa (D'Autréaux & Toledano, 2007).

### **Yap1 como regulador principal de la ráfaga oxidativa**

Yap1 activa la transcripción por la unión al ADN en regiones promotoras (Toone & Jones, 1998). En el caso de *S. cerevisiae*, alrededor de 500 genes que responden al estrés oxidativo, muchos de ellos muestran el sitio de unión a Yap1, siendo la secuencia TT/GAC/GT/CA/A el sitio de unión típico (Fernandes *et al.*, 1997; Molina & Kahmann, 2007).

En este sentido, Yap1 activa genes con función antioxidante en respuesta a situaciones de estrés oxidativo, además de otros tipos de estrés como el osmótico y el inducido por etanol (Bleocanica *et al.*, 2013). Por mencionar algunos, se incluyen el *GSH1* ( $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa), *GSH2* (glutación sintasa), *GPX2* (glutación peroxidasa) *TRX2* (tioredoxina), *TSA1* (tioredoxina peroxidasa), *TRR1* (tioredoxina reductasa 1), *AHP1* (alquil-hidroperoxido reductasa 1) (Lushchack, 2011; Zhang *et al.*, 2016). La capacidad para detoxificar ROS mediante Yap1 es esencial en la virulencia en hongos como *A. alternata*, *C. albicans*, *M. oryzae* y *U. maydis* siendo también el principal regulador ante el estrés oxidativo (Molina & Kahmann, 2007; Yingjiao, 2016).

### **Localización subcelular y activación de Yap1**

En condiciones normales Yap1 se distribuye entre el citoplasma y el núcleo, pero sobre todo se localiza en el citoplasma debido a su exportación activa desde

el núcleo por la exportina Crm1. La presencia de CRD (por sus siglas en inglés, Cysteine Rich Domain) en Yap1, es necesaria para la exportación del núcleo y está altamente conservada en proteínas que son homólogas a Yap1 (Lushchak, 2011). En *U. maydis* se realizó la fusión de la proteína verde fluorescente con Yap1 para conocer su localización y se sabe que éste se localiza en el núcleo en respuesta a estrés oxidativo (Molina & Kahmann, 2007). Los organismos eucariotas muestran conservado el dominio N-terminal de unión al ADN, que consiste de un “zipper” de leucina que regula la dimerización y una región adyacente básica que interactúa específicamente con el ADN. Por otra parte, la región C-terminal que posee los dominios ricos en cisteína (c-CRD) son altamente conservados, y tienen una función muy importante en la resistencia al estrés. Yap1 no detecta directamente la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta función es llevada a cabo por Gpx3, una peroxidasa dependiente de glutatión (Molina & Kahmann, 2007; Lushchak, 2011). Como primer paso uno de los residuos de cisteína junto con Gpx3 se oxida a sulfóxido y este a su vez interactúa con un residuo de cisteína de Yap1, haciendo que cambie su conformación mediante la formación de dos puentes disulfuro intramoleculares que activan la proteína y enmascaran la secuencia de exportación nuclear, esto provoca que se acumule en el núcleo y comience la expresión de genes específicamente involucrados en la respuesta a estrés (Delaunay *et al.*, 2000; Molina & Kahmann, 2007; Lushchak, 2011).

### **Función de Yap1 en hongos fitopatógenos**

En *F. graminearum* se sabe que FgYap1 además de estar involucrado en inducir el mecanismo de respuesta a estrés oxidativo, las mutantes  $\Delta yap1$  son sensibles al estrés osmótico y al cadmio. También se ha visto en este organismo que FgYap1 es importante para la acumulación de micotoxinas (Montibus *et al.*, 2013).

En el caso de *M. oryzae*, Yap1 es un factor clave en la regulación de la expresión de genes involucrados en la detoxificación, moléculas involucradas en el estrés oxidativo mediante la regulación de lacasas y la actividad de peroxidases, también es requerido para el crecimiento aéreo, la formación de conidia y la

patogenicidad (Guo *et al.*, 2011; Montibus *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Otro ejemplo de fitopatógeno es *Alternaria alternata*, en el que la detoxificación de las ROS es crucial para la patogenicidad. Existen diferentes rutas regulatorias para lograr dicha detoxificación, una de ellas es mediante Yap1, entre otros (Chen *et al.*, 2017).

En *Botrytis cinerea* Bap1 el homólogo a Yap1 es esencial para la supervivencia en altas concentraciones de peróxido y menadiona en condiciones *in vitro*, este factor de transcripción también está implicado en la regulación de una notable cantidad de genes que codifican para proteínas involucradas con el metabolismo y en la diferenciación pero no está asociada a la patogenicidad (Temme & Tudzynski, 2009).

En *U. maydis* la función de Yap1 consiste en regular la expresión de genes que actúan como detoxificadores, en el metabolismo de antioxidantes como el glutatión, el ascorbato, el folato, así como otros genes que están involucrados en la reparación y estabilidad del ADN, el plegamiento adecuado de las proteínas, eliminación de proteínas que sufrieron daño durante la ráfaga oxidativa, transporte, señalización, componentes de la pared y la membrana celular (Molina & Kahmann, 2006).

### **Función de Yap1 en hongos patógenos de humanos**

En *C. neoformans*, como mencionamos anteriormente un patógeno oportunista de humanos, Yap1 está fuertemente asociado a la resistencia del fluconazol, fármaco que se utiliza en el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas. Parece ser que ésta función de resistencia por parte de Yap1 no interviene en otros hongos de importancia como *C. albicans*, *C. glabrata* y *A. fumigatus* (Qiao *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2015).

### **Proteínas detoxificadoras de ROS**

Las peroxidasas son un grupo de oxidoreductasas que catalizan la oxidación de varios compuestos mediante el uso de peróxidos. Éstas se dividen en dos grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia del cofactor hemo (Choi *et al.*,

2014). Las peroxidases son clasificadas en dos superfamilias de acuerdo al grupo de organismos en el que se han identificado. En el primer grupo se centran las bacterias, los hongos y las plantas, en el segundo grupo los animales. La primera superfamilia fue propuesta por Karen Welinder en 1992, la cuál se clasifica en tres clases (Clase I, Clase II y Clase III) (Passardi *et al.*, 2007; Zámocky *et al.*, 2010).

La Clase I, las peroxidases intracelulares, en estas se incluyen a la citocromo-c-peroxidasa (CCP, por sus siglas en inglés), es una proteína soluble encontrada en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La ascorbato peroxidasa (AP, por sus siglas en inglés), es la enzima principal encargada de remover el peróxido en los cloroplastos y en el citosol en plantas. En bacterias, las catalasas-peroxidases, ambas con actividad de catalasa y de peroxidasa, protegen principalmente a las células antes situaciones de estrés oxidativo (Choi *et al.*, 2014).

La Clase II, en hongos consiste en peroxidases secretoras, como las ligninasas o peroxidases de lignina (LiPs, por sus siglas en inglés), éstas son glicoproteínas monoméricas involucradas en la degradación de lignina. Las peroxidases dependientes de manganesio (MnPs, por sus siglas en inglés), éstas sirven para la reducción del substrato (Hofrichter *et al.*, 2010; Lundell *et al.*, 2010).

La Clase III, son peroxidases de plantas, las cuales tienen múltiples funciones en diferentes órganos o tejidos de la planta. Los cuales incluye remover el peróxido de los cloroplastos y el citosol, oxidación de componentes tóxicos, biosíntesis de la pared celular. Los patógenos de plantas, utilizan las peroxidases para detoxificar las ROS, producidas por el hospedero (Bakalovic *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2014).

## HIPÓTESIS

La disminución en la virulencia de las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis* se debe a defectos en la capacidad antioxidante regulada por Yap1, para contrarrestar el mecanismo de defensa oxidativo establecido por la planta.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la importancia de la trehalosa en la respuesta a estrés *in vitro* y en el proceso infectivo de *U. maydis* ante la respuesta oxidativa de la planta de maíz y la relación con el factor de transcripción Yap1.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar el fenotipo, en condiciones de estrés oxidativo, osmótico, daño en pared celular y por presencia de metales pesados de las cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .

Determinar la participación de *UmYAP1* en la síntesis de trehalosa.

Determinar la expresión del gen *UmYAP1* en las mutantes  $\Delta tps2$ .

Analizar la capacidad infectiva de las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .

Analizar la expresión de los genes detoxificadores que codifican para citocromo-c-peroxidasa (*Um01947*) y alquil-hidroperóxido reductasa (*Um02153*) en el proceso infectivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Secuencias

Las secuencias de los genes *TPS2* (*Um10650*), *YAP1* (*UMAG\_05169*), citocromo-C-peroxidasa (*Um01947*) y alquil-hidroperóxido reductasa (*Um02153*), se obtuvieron de la base de datos de *U. maydis* (<http://www.genome.jgi.doe.gov>) y del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Así mismo, se realizó un BLAST de cada una de las secuencias con las que se trabajó, para validarlas con secuencias homólogas de las bases de datos. Para realizar este trabajo se diseñaron los oligonucleótidos y se verificó que no formaran dímeros o estructuras secundarias (<http://biotools.nubic.northwestern.edu>). Los cuales se sintetizaron en la compañía Sigma®.

### Modelado por homología de la proteína Yap1

Para la predicción de la estructura de la proteína Yap1, se utilizó la técnica de modelado por homología con el servidor I-TASSER (Zhang, 2009; Ambrish *et al.*, 2012; Yang & Zhang, 2015). Se obtuvo la secuencia de amino ácidos de la proteína Yap1 de *U. maydis* de la base de datos de *U. maydis* (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>). Enseguida, I-TASSER construye modelos estructurales en tercera dimensión (3D), donde va ensamblando fragmentos de plantillas o templados, que son fragmentos de otras proteínas que tienen alto porcentaje de identidad con la proteína de interés, los templados los selecciona el mismo servidor de I-TASSER con base a los conocimientos biológicos de las proteínas de interés al hacer coincidir los modelos de estructuras de proteínas ya conocidas de diferentes bases de datos (Yang & Zhang, 2015).

### Análisis *in silico* de los promotores

Las secuencias de los genes de interés, se recuperaron en formato FASTA de las bases de *U. maydis* (<http://www.genome.jgi.doe.gov>) y se utilizaron para

buscar los sitios de unión del factor de transcripción Yap1 en el ADN en el programa YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking) de la base de datos <http://www.yeasttract.com/view.php> siguiendo las instrucciones del programa.

### Cepas, medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas que fueron empleadas para este trabajo (Tabla 1), se crecieron en Medio Completo (MC) (Holliday, 1961) [extracto de levadura 1%, 62.5 mL de solución de sales para *U. maydis*, peptona 0.5 %, nitrato de amonio 0.15% y glucosa 1%] a 28° C en agitación constante a 150 rpm. Las cepas se conservaron a -80°C en 50% glicerol, cuando fueron requeridas se recuperaron en MC a 28°C, adicionadas con el agente de selección correspondiente, carboxina (3 µg·mL<sup>-1</sup>, Fluka Analytical) y/o higromicina B (200 µg·mL<sup>-1</sup>, Invitrogen®).

**Tabla 1. Lista de cepas de *U. maydis* utilizadas en este trabajo.**

NOMBRE	GENOTIPO	FUENTE
FB1	Silvestre a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	F. Banuet
FB2	Silvestre a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	F. Banuet
AC234	Mutante $\Delta tps2, a_1 b_1$ cbx <sup>R</sup>	Cervantes <i>et al.</i> , 2016
AC277	Mutante $\Delta tps2, a_2 b_2$ cbx <sup>R</sup>	Cervantes <i>et al.</i> , 2016
517	Mutante $\Delta yap1, a_1 b_1$ hyg <sup>R</sup>	Molina & Kahmann, 2007
520	Mutante $\Delta yap1, a_2 b_2$ hyg <sup>R</sup>	Molina & Kahmann, 2007
EH627	Doble mutante $\Delta tps2::\Delta yap1, a_1 b_1$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup>	Este trabajo
EH628	Doble mutante $\Delta tps2::\Delta yap1, a_2 b_2$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup>	Este trabajo
EH629	Doble mutante $\Delta tps2::\Delta yap1, a_2 b_2$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup>	Este trabajo
EH630	Doble mutante $\Delta tps2::\Delta yap1, a_1 b_1$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup>	Este trabajo

**Abreviaturas:** Cepas haploides; a<sub>1</sub>b<sub>1</sub> y a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>,  $\Delta$ ; mutante, cbx<sup>R</sup>; resistencia a carboxina, hyg<sup>R</sup>; resistencia a higromicina B.

### Manipulación de ácidos nucleicos

#### Extracción de ADN

La purificación de ADN, se realizó con base en los protocolos estándar (Sambrook & Russell, 2001). A partir del cultivo de las células de interés, con crecimiento hasta la fase estacionaria. Las células fueron centrifugadas a 3,500

revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos para obtener la pastilla celular. Posteriormente ésta fue suspendida en 200  $\mu\text{L}$  de TE [10 mM de Tris, 1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetracético) pH 8]. La muestra fue transferida a tubos Eppendorf y se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis: 2% Tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA. Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (1:1) y 0.3 gr de perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro, lavadas con ácido nítrico y estériles). Se colocaron 3 minutos en el vórtex, para romper la pared celular. Se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó la fase acuosa en tubos Eppendorf nuevos estériles. Se adicionó a cada una de las muestras 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se incubó 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . En seguida, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se llevaron a vórtex durante un minuto, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y nuevamente se recuperó la fase acuosa en tubos Eppendorf nuevos y estériles. Posteriormente el ADN fue precipitado con 1/10 del volumen de la muestra de Acetato de Sodio 3 M y con dos volúmenes de 95% etanol frío. Se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos, la pastilla obtenida fue lavada con 300  $\mu\text{L}$  de 75% etanol frío, nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, se decantó y se dejaron secar las muestras. Finalmente el ADN se disolvió en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular (gbm).

### **Amplificación de ADN**

Para las reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific) y se realizó en el termociclador BioRad®T100. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se observaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con Bromuro de Etidio, analizados con luz Ultra Violeta (UV) en el fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Image Lab™ Software BIO-RAD). En la tabla 2, se indican todas las secuencias de los oligonucleótidos que fueron utilizadas para este trabajo, la tabla 3, muestra la especificación de los amplicones que se utilizaron para el mismo.

**Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados.**

NÚMERO DE OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA BLANCO	SECUENCIA
2035	<i>UmACTINA</i>	5'-CTTCCTGACGGACAGGTGAT-3'
2036	<i>UmACTINA</i>	5'-CTCGGGAGGAGCAACAATC-3'
2157	<i>UmACTINA</i>	5'-GCGAACTAGTGTTGCGAGAT-3'
2037	<i>UmEF1</i> alfa 5'	5'-CGTGGTAACGTCTGCTCTGA-3'
2038	<i>UmEF1</i> alfa 3'	5'-ACCGGACTTGATGAACTTGG-3'
3HYG	pDNOR hph	5'-CCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTC-3'
2148	pDNOR hph	5'-GCGGGCTTATGATTCATTCA- 3'
2149	<i>UmYAP1</i> ORF	5'-CTTGCTCGACCGATCCTGGT- 3'
2165	pDNOR hph	5'-ATTGCCTTGTGGCCACTCGA- 3'
2166	<i>UmYAP1</i> ORF	5'-TCCAGCCCATCATCTTCATC-3'
2114	pDNOR hph	5'-ATTGCAGGCGAGAAGAAATG-3'
1071	pDNOR cbx	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
1072	pDNOR cbx	5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
1720	Río arriba <i>UmTPS2</i>	5'-GCGGTACTCCATTCCACACCT-3'
1721	Río abajo <i>UmTPS2</i>	5'-TGGCTAAACAACCAGAAAACG-3'
2174	<i>Um01947</i> ORF	5'-GGTCCCTGGGTCAACTCGCC-3'
2175	<i>Um01947</i> ORF	5'-GCGGAGCTGACTTGACTCT-3'
2182	<i>Um02153</i> ORF	5'GGTACCTGTGGAAAGCCAAA-3'
2183	<i>Um02153</i> ORF	5'ATGGTATTGCGTGGGATGAT-3'

Abreviaturas: TPS2: Trehalosa-fosfato-fosfatasa; YAP1: Yeast Associated Protein 1; EF1:

Elongation Factor 1

**Tabla 3. Especificación de los amplicones.**

AMPLICÓN	NÚMERO DE OLIGONUCLEÓTIDO	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño (pb)
ORF ACTINA	2035-D 2036-R	60 °C	276
ORF EF1 $\alpha$	2037-D 2038-R	66 °C	270
ORF YAP1	2149-D 2166-R	60 °C	484
UP-pDNOR ( $\Delta tps2$ )	1720-D 1071-R	57 °C	1261
DOWN-pDNOR ( $\Delta tps2$ )	1072-D 1721-R	57 °C	1065
5'HPH ( $\Delta yap1$ )	3HYG-D 2148-R	58 °C	2445
3'HPH ( $\Delta yap1$ )	2165-D 2114-R	60 °C	3049
<i>Um02153</i>	2182 2183	63 °C	230
<i>Um01947</i>	2174 2175	63 °C	352

Abreviaturas: D Oligonucleótido derecho; R Oligonucleótido reverso; °C grados Celsius; pb pares de bases

### Extracción de ARN

A partir del cultivo de células de las cepas de interés, éstas fueron molidas en mortero previamente estéril y congelado con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>). Se recuperó el polvo (aproximadamente 100 mg) y se añadió 1 mL del reactivo Trizol (Invitrogen®). Posteriormente se agitó en vórtex durante dos minutos y se mantuvieron las muestras por cinco minutos a temperatura ambiente, se añadieron 400  $\mu$ L de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>). La muestra fue agitada suavemente por 15 segundos y se mantuvo a temperatura ambiente por un periodo de 2 a 3 minutos.

Se centrifugaron a 12 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. En seguida, se recuperó la fase acuosa y ésta se precipitó con 600 µL con una solución de citrato de sodio 0.8 M y NaCl 1.2 M y 700 µL de isopropanol. Se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla que se obtuvo se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se decantó y se dejó secar. Finalmente se añadieron 80 µL de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (0.1% DEPC) para cada una de las muestras y se incubaron a 55°C por dos minutos para disolver el ARN. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia en el nanodrop para verificar la calidad y concentración del ARN obtenido. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

El ARN purificado por Trizol se trató con DNAsa I (ThermoFisher SCIENTIFIC, libre de RNAsa, 1 µL (1 U/1µL). Se trató 1 µg de RNA (400 ng/µL<sup>-1</sup>), 1 µL 10X Buffer con MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de DNAsa I, se llevó a 10 µL con agua-DEPC. La reacción fue incubada a 37° C durante 30 minutos, posteriormente se añadió 1 µL de 50 mM EDTA y se incubó a 65° C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió 0.5 µL oligo dT (10 ng) a 10 µL de ARN tratado con DNAsa I, se incubó la reacción a 65° C durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 4 µL de amortiguador 5X, 0.5 µL de inhibidor de RNAsa RiboLock, 2 µL de dNTP's (10 mM) y 1 µL de enzima Transcriptasa Reversa (RT), para un volumen final de 20 µL. Como control para cada muestra, se prepararon reacciones sin la enzima RT. La reacción se incubó a 42° C durante una hora y posteriormente a 72° C durante 10 minutos. El ADNc así sintetizado se utilizó para realizar los estudios de expresión génica. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **RT-PCR**

La expresión de los genes *TPS2*, *YAP1*, *Um01947* (citocromo-C-peroxidasa) y *Um02153* (alquil-hidroperóxido reductasa), se analizó por

amplificación PCR punto final con los los oligonucleótidos indicados en la Tabla 3. Los productos fueron observados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con Bromuro de Etidio [6  $\mu$ L (10 mg por mL) para cada 100 mL de Buffer TAE] y observados con luz UV en el fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ **XR+** Image Lab™ Software BIO-RAD). El análisis densitométrico de la expresión de los genes de interés, se realizó a partir del PCR punto final con el ADNc sintetizado, usando el programa *ImageJ* para el análisis de la imagen. Se utilizó como control positivo ADN genómico de la cepa silvestre FB2 (ADNg) y agua como control negativo. La expresión de los genes de interés fué calculada con base a la expresión de los genes constitutivos de actina y del factor de elongación  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) de *U. maydis* a los cuales se les asignaron valores arbitrarios correspondientes al 100%. El RT-PCR se realizó a 24 ciclos para los ensayos con tratamiento oxidativo y osmótico y 32 ciclos para el caso de la expresión de *U. maydis* en la planta. Los valores se analizaron con una prueba de ANOVA con post-test Tukey ( $p < 0.05$ ) en el programa PRISM GraphPad® Versión 6.0c. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Análisis de la expresión de *UmTPS2* en $\Delta yap1$**

Para el análisis de la expresión del gen *TPS2* de *U. maydis* en la cepa mutante  $\Delta yap1$  y como control la cepa silvestre FB2, en presencia de los agentes estresantes osmótico (0.5 M NaCl) y oxidativo (2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), previamente se inocularon 600  $\mu$ L de células de cada cepa y se incubaron a 28°C en agitación constante a 150 rpm durante 18 horas en MC. Posteriormente el cultivo se pasó a tubos falcon y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Las células fueron lavadas en dos repeticiones con agua destilada estéril. Finalmente las células fueron suspendidas en 10 mL de agua destilada estéril. Previamente se preparó medio mínimo a pH 7 (MM7, 30mM Tris HCl). Se utilizó como control MM7 sin agente estresante, para el estrés osmótico se utilizó 0.5 M NaCl y para el estrés oxidativo 2.5 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se colocaron los 10 mL del cultivo en MM7 y se incubaron a 28°C durante 3 horas en agitación constante a 150 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se

desechó el sobrenadante y las células fueron guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente realizar la extracción de ARN.

### **Análisis de la expresión de *UmYAP1* en la mutante incapaz de sintetizar trehalosa**

Para el análisis de la expresión del gen *YAP1* de *U. maydis* en la cepa mutante  $\Delta tps2$  y como control la cepa silvestre FB2, en presencia de los agentes estresantes osmótico (0.5 M NaCl) y oxidativo (2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), previamente se inocularon 600  $\mu\text{L}$  de células de cada cepa y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación constante a 150 rpm durante 18 horas en MC. Posteriormente el cultivo se pasó a tubos cónicos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Las células fueron lavadas en dos repeticiones con agua destilada estéril. Finalmente las células fueron suspendidas en 10 mL de agua destilada estéril. Previamente se preparó medio mínimo a pH 7 (MM7, 30mM Tris HCl). Se utilizó como control MM7 sin agente estresante, para el estrés osmótico se utilizó 0.5 M NaCl y para el estrés oxidativo 2.5 mM ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se colocaron los 10 mL del cultivo en MM7 y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas en agitación constante a 150 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células fueron guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente realizar la extracción de ARN.

### **Análisis de la expresión de *Um01947* y *Um02153* durante la infección en plantas de maíz**

Para el análisis de la expresión de los genes *Um01947* y *Um02153* en el proceso infectivo. Se infectaron plantas de maíz variedad cacahuazintle con las cepas silvestres FB1xFB2, mutantes  $\Delta tps2$  (234X277),  $\Delta yap1$  (517X520) y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  (EH627XE629 y EH628XE630). Posteriormente las plantas infectadas fueron colectadas a las 16 horas, 2 días y 6 días posteriores a la infección, fueron guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  inmediatamente, para posteriormente realizar la extracción de ARN.

## Extracción de trehalosa

Para la extracción de trehalosa, se realizó un pre-inoculo de las cepas de interés en 5 mL con MC líquido, a 28°C durante 18 hrs en agitación constante a 150 rpm. Adicionado con los antibióticos carbenicilina ( $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para las cepas silvestres (FB1/FB2) e higromicina B ( $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para la cepa mutante [*Δyap1* (520)]. A partir de éste, se preparó un inoculo con 80  $\mu\text{L}$  de células en 50 mL de MC se incubó a 28°C durante 18 horas en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente las células se observaron al microscopio para descartar contaminación. Éstas fueron centrifugadas a 3 000 rpm durante cinco minutos y se lavaron con agua destilada estéril en dos repeticiones. Se determinó su DO en el equipo GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC. Se inocularon 200 mL de MM pH7 (Tris-HCl pH7, 30 mM) a una concentración de 0.02 de células con  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  y se incubó durante 15 hrs a 28°C en agitación (150 rpm). Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron los agentes estresantes, 2.5 mM de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y 0.5 M de NaCl de manera independiente y continuó la incubación por 3 horas más. Como control, el cultivo correspondiente se mantuvo sin adición de agente estresante. Una vez que se cumplió el tiempo, las células fueron centrifugadas, se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se conservó a -80°C. Posteriormente se trituró con nitrógeno líquido ( $\text{N}_{2\text{liq}}$ ) en el mortero. Las muestras se pesaron en matraces de 50 mL y se adicionaron 30 mL de etanol grado HPLC. Cada una de las muestras se evaporó mediante baño maría (evitándose que la muestra se caramelizara). Posteriormente a cada una de las muestras se les adicionó 1 mL de acetonitrilo:agua (1:1) ambos grado HPLC y se mezcló hasta homogenizar la muestra. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cuál fue filtrado y recuperado en tubos cónicos de 1.5 mL nuevos y estériles. Posteriormente las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Cromatografía del LAN-PlanTECC, CINVESTAV-Irapuato. Se preparó una curva estándar utilizando D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich® con las siguientes concentraciones  $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  con una correlación de 0.9999. En un HPLC Agilent 1200 bomba isocrática con detector de índice de refracción.

La columna que se utilizó es de carbohidratos de Agilent 4.6 x 150 mm de 5 micrones (catálogo 843300-908), Acetonitrilo al 75%, a una temperatura de 30°C y un flujo del solvente de 1.5 mL·min<sup>-1</sup> isocrático 10 minutos. Los valores se analizaron con una prueba de ANOVA de dos vías con post-test Tukey ( $p < 0.05$ ) en el programa PRISM GraphPad® Versión 6.0c. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Reacción fuz**

La capacidad de apareamiento de las mutantes simples  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  se determinó por reacción “fuz” (Banuett & Herskowitz, 1989). Se realizaron inóculos de 5 mL de cada una de las cepas de interés, se incubaron por 24 horas en agitación constante a 150 rpm a 28°C. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron las células con agua destilada estéril, se verificaron al microscopio para descartar contaminación y se realizó el conteo en la cámara de Neubauer. Las cepas se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  células·mL<sup>-1</sup>. En seguida, se sembraron sobre cajas con MC con 1% carbón activado, se colocaron simultáneamente 5  $\mu$ L de la cepa  $a_1b_1$  y 5  $\mu$ L de la cepa sexualmente compatible  $a_2b_2$ . Una vez seca la gota, las cajas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas. Verificamos que el crecimiento tuviera un aspecto blanco algodonoso para considerarlas como reacción fuz positiva. Se tomaron fotografías con el estereoscopio LEICA EZ4D, y las imágenes fueron procesadas con la aplicación Leica Acquire versión 3.4.1 para Mac OS X 10.9. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Germinación de teliosporas**

Los tumores que se obtuvieron de las plantas de maíz inoculadas con las cruza de las cepas mutantes  $\Delta tps2$  ( $a_1b_1$ ) y  $\Delta yap1$  ( $a_2b_2$ ), fueron macerados en el mortero en condiciones de esterilidad con 5 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, el macerado se recuperó con una espátula y se filtró en un tubo cónico de 50 mL, se observó al microscopio la presencia de teliosporas. El contenido fue centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos y se decantó

cuidadosamente para no perder las teliosporas. A continuación la pastilla se re-suspendió en 5 mL de agua destilada estéril y se observaron las teliosporas al microscopio. Se agregaron 5 mL de sulfato de cobre 3 %, carbenicilina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), kanamicina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se incubó a  $28^\circ \text{C}$  durante 2 horas a 120 rpm. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 3500 rpm, se decantó lentamente para no perder las teliosporas y se agregaron 10 mL de agua destilada estéril, se mezcló con vórtex. Nuevamente se centrifugó a 3500 rpm, se decantó y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones (1:100) y 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de teliosporas fueron esparcidas con perlas de vidrio estériles en cajas de Petri con MC adicionado de los antibióticos kanamicina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), carbenicilina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 0.5 % tritón X-100. Se incubaron a  $28^\circ \text{C}$  y se observó el crecimiento de colonias de *U. maydis*. Posteriormente se recuperaron 100 colonias y estas fueron depositadas en tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de agua destilada estéril, posteriormente se agitaron en vórtex durante dos minutos y se realizó una dilución 1:10, se esparcieron 200  $\mu\text{L}$  y 400  $\mu\text{L}$  en cajas de petri con MC con carbenicilina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y kanamicina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), las cajas fueron incubadas a  $28^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Las colonias aisladas se recuperaron en MC sólido, suplementado con higromicina B ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y carboxina ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Se incubaron a  $28^\circ \text{C}$  durante 24 horas. De las cepas resistentes a ambos antibióticos, las dobles mutantes, se determinó del sexo de cada una por reacción fuz. Se procedió a comprobar la doble mutación por PCR.

## **Análisis fenotípico**

### **Ensayos de estrés *in vitro***

Para este experimento se utilizaron diferentes agentes estresantes que inducen estrés oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , menadiona, *tert*-butilhidroperóxido, rosa bengala expuesta a luz y oscuridad), estrés osmótico (NaCl, KCl), daño a pared celular (SDS, rojo congo y cafeína), salino (LiCl), radiación por luz UV, ácido acético y estrés causado por metales pesados ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$ ). El respectivo agente estresante se adicionó en la concentración indicada (Tabla 4).

Las cepas seleccionadas, se inocularon en MC líquido, en agitación constante a 150 rpm durante 18 horas a 28°C. Posteriormente por centrifugación se obtuvo la pastilla celular, ésta fue lavada con agua destilada estéril. Se realizó el conteo de células en la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $10^8$  células·mL<sup>-1</sup> (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016). Se prepararon diluciones desde  $10^7$  a  $10^3$  y se sembraron 10 µL de cada dilución sobre MM7 (30 mM Tris, HCl). Las cajas se incubaron a 28°C durante 72 horas. Se tomaron fotografías con una cámara digital CANON EOS REBEL T3i. Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Tabla 4. Condiciones de estrés en placa para *U. maydis***

ESTRÉS	CONCENTRACIÓN
Control	28°C
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.5 mM
Menadiona	0.8 mM
<i>tert</i> -butil hidroperóxido	1.3 mM
Rosa de bengala (luz)	(120 µg/ml)
Rosa de bengala (oscuridad)	(120 µg/ml)
NaCl	0.8 M
KCl	1 M
Rojo congo	(13 µg/ml)
SDS	0.0075%
Cafeína	3 mM
Luz UV	30 000 J/m <sup>2</sup>
Ácido acético	3.5 mM
LiCl	12 mM
CoCl <sub>2</sub>	0.4 mM
CdCl <sub>2</sub>	0.6 mM
CdSO <sub>4</sub>	0.8 mM

### Crecimiento en forma de hifa

Las cepas de interés crecieron en MC durante 18 horas en agitación constante a 150 rpm. Una vez transcurrido el tiempo las células fueron centrifugadas a 4 500 rpm durante 5 minutos y se resuspendió la pastilla celular en agua destilada estéril y se incubó durante 24 horas a 4°C. Posteriormente las células fueron ayunadas por 30 minutos a 28°C en agitación constante a 150 rpm. En seguida, se tomaron 250 µL y se inocularon 5 mL de MM pH 7 (ajustado con

NaOH) con 1% glucosa (crecimiento en forma de levadura) y 250  $\mu\text{L}$  en 5 mL de MM pH 2.8 (ajustado con 30% HCl) con 1% glucosa (crecimiento en forma de micelio). Se incubó a 28°C durante 24 horas en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente se observó al microscopio. Las células se tiñeron con calcofluor White Stain, Fluka Analytical 18909 (CFW, por sus siglas en inglés), para ello se centrifugó 1 mL del cultivo, la pastilla se re-suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de CFW. Finalmente las células teñidas se observaron en el microscopio compuesto triocular EPI-fluorescente Mod. M834FLR a 40X. Las imágenes se capturaron en el programa Scopelimage 9.0. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Pruebas de patogenicidad en plantas de maíz**

La capacidad infectiva de las cepas fue determinada en plantas de maíz de la variedad “cacahuazintle” de 8 a 12 días de edad. Estas fueron sembradas en condiciones de invernadero (Facultad de Ciencias Naturales). Las semillas de maíz se colocaron en un frasco de vidrio con una solución de cloro al 10 % (cloro comercial con agua destilada). Estas se agitaron vigorosamente por espacios de 10 minutos por dos ocasiones. Posteriormente en otro frasco de vidrio limpio, las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril. Finalmente, se agregaron 125  $\mu\text{L}$  de fungicida (ANTRAK 50 al 4 %) con 50 mL de agua destilada estéril y se dejó en reposo durante 24 horas. Una vez concluido el tiempo, las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril en dos repeticiones. Y se sembraron en mezcla de suelo general.

Para preparar el preinóculo, se sembraron en MC líquido las cepas de interés y se incubaron durante 18 horas en agitación constante a 150 rpm a 28°C. Se inocularon 125  $\mu\text{L}$  del cultivo anterior en 10 mL de MC adicionado de carbenicilina ( $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Posteriormente se colectaron las células y fueron lavadas con agua destilada estéril, se contaron en la cámara de Neubauer y se preparó una suspensión de células a  $1\times 10^8$  cel·mL<sup>-1</sup>. Se mezcló en una relación 1:1 el par de cepas sexualmente compatibles. Las plantas se inocularon en la base del tallo, con una jeringa para insulina con 300  $\mu\text{L}$  de esta suspensión celular. Los signos

de la enfermedad: clorosis, antocianinas, tumores pequeños, tumores basales que doblan la planta y muerte de la misma (Chavan *et al.*, 2013), se evaluaron a los 14 días. Las cruces de las cepas sexualmente compatibles utilizadas fueron mezcladas 1:1 de la siguiente manera: 1) como control, cepas FB1 [a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>] X FB2 [a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>]; 2) mutantes  $\Delta tps2$ , cepas 234 [a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>] X 277 [a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>]; 3) mutantes  $\Delta yap1$ , cepas 517 [a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>] X 520 [a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>] y 4) dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  627 [a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>] X 629 [a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>] y 628 [a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>] X 630 [a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>]. Se sembraron entre 131 y 138 plantas por cada mezcla de cepas sexualmente compatibles. Las plantas fueron fotografiadas con una cámara digital EOS REBEL T3i. Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con post-test Duun ( $p \leq 0.05$ ) con el programa PRISM GraphPad® Versión 6.0c. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS

### **En *U. maydis* la familia Yap está compuesta sólo por la proteína Yap1**

De acuerdo con lo reportado sobre la familia Yap en *S. cerevisiae* y *C. albicans* se han descrito 8 proteínas tipo Yap (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). Es por ello que realizamos un análisis *in silico* en la base de datos de *U. maydis*, para determinar si en este hongo se trata también de una familia génica. Encontramos que Yap1 comparte similitud con las ocho proteínas identificadas que pertenecen a la familia Yap de *S. cerevisiae*, aunque la homología encontrada con cada una de las proteínas es baja, puesto que es solamente en unos pocos aminoácidos y la única secuencia con similitud importante en *U. maydis* fue en Yap1 (*Um05169*). Estos datos indican que, en este basidiomiceto solo existe un gen que codifica para una proteína Yap, denominada como Yap1 y que además es capaz de realizar funciones similares a las ocho proteínas pertenecientes a la familia Yap de *S. cerevisiae*. Encontramos que la proteína Yap de levadura dio la similitud más alta con la proteína Yap1 de *U. maydis* (43%) ésta similitud se ubica en la región N-terminal que coincide al sitio activo (la homología con las proteínas Yap1, Yap2, Yap3, Yap4 y Yap7 se localiza en la región N-terminal, la de Yap6 en la región C-terminal, mientras que la de Yap5 y Yap8 en medio de ambas regiones).

### **Identificación *in silico* de sitios de reconocimiento de Yap1 en los promotores de los genes *TPS1*, *TPS2*, *YAP1*, *Um01947* y *Um02153***

Las secuencias de los promotores de los genes *TPS2* (*Um10650*), *YAP1* (*UMAG\_05169*), citocromo-c-peroxidasa (*Um01947*) y alquil-hidroperóxido reductasa (*Um02153*) de *U. maydis*, se obtuvieron de la base de datos de *Ustilago maydis* (<http://www.genome.jgi.doe.gov>) (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>), así como de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

De acuerdo al análisis realizado en la base de datos de YEASTRACT, obtuvimos la información señalada en la Tabla 5, en la cual se indica la secuencia

de unión del factor de transcripción Yap1, el gen en donde se identificaron los motivos o secuencias de ADN, su ubicación en los promotores de los genes de interés y el sentido que tiene la secuencia, ya que los motivos se pueden ubicar en ambas orientaciones. Toone & Jones, 1999 mencionan que Yap1 de *Sacharomyces* activa la transcripción génica por la unión al DNA, con secuencias específicas en los promotores de los genes regulados. Sin embargo, de acuerdo con la base de datos YEASTRACT no se encontró la secuencia de unión de Yap1 en la región promotora de *TPS2* de *U. maydis*. No obstante, eso no significa que Yap1 no regula la producción de la molécula de la trehalosa. Puesto que, nuestros resultados indican que el sitio de unión de Yap1, sí está presente en el promotor de *TPS1*. Así mismo, encontramos que Yap1 se autoregula, puesto que tiene secuencias de unión en su región promotora. Respecto a los genes que codifican al citocromo-c-peroxidasa y a la alquil-hidroperóxido reductasa, también encontramos posibles sitios de unión de Yap1 en sus regiones promotoras.

**Tabla 5. Secuencias y sitios de unión del factor Yap1.**

GEN	SECUENCIA CONSENSO	POSICIÓN	SENTIDO
YAP1	TGACTAA	-919	S
YAP1	TGCACAA	-952	S
<i>Um01947 (alquil-hidroperóxido reductasa)</i>	TTACTAA	-661	A
<i>Um01947 (alquil-hidroperóxido reductasa)</i>	TGACTAA	-1278	A
<i>Um02153 (citocromo-c-peroxidasa)</i>	TKACAAA	-51	A
<i>Um02153 (citocromo-c-peroxidasa)</i>	TGACAA	-51	A
TPS1	TTACTAA	-272	A
TPS2	TGAC	-	-

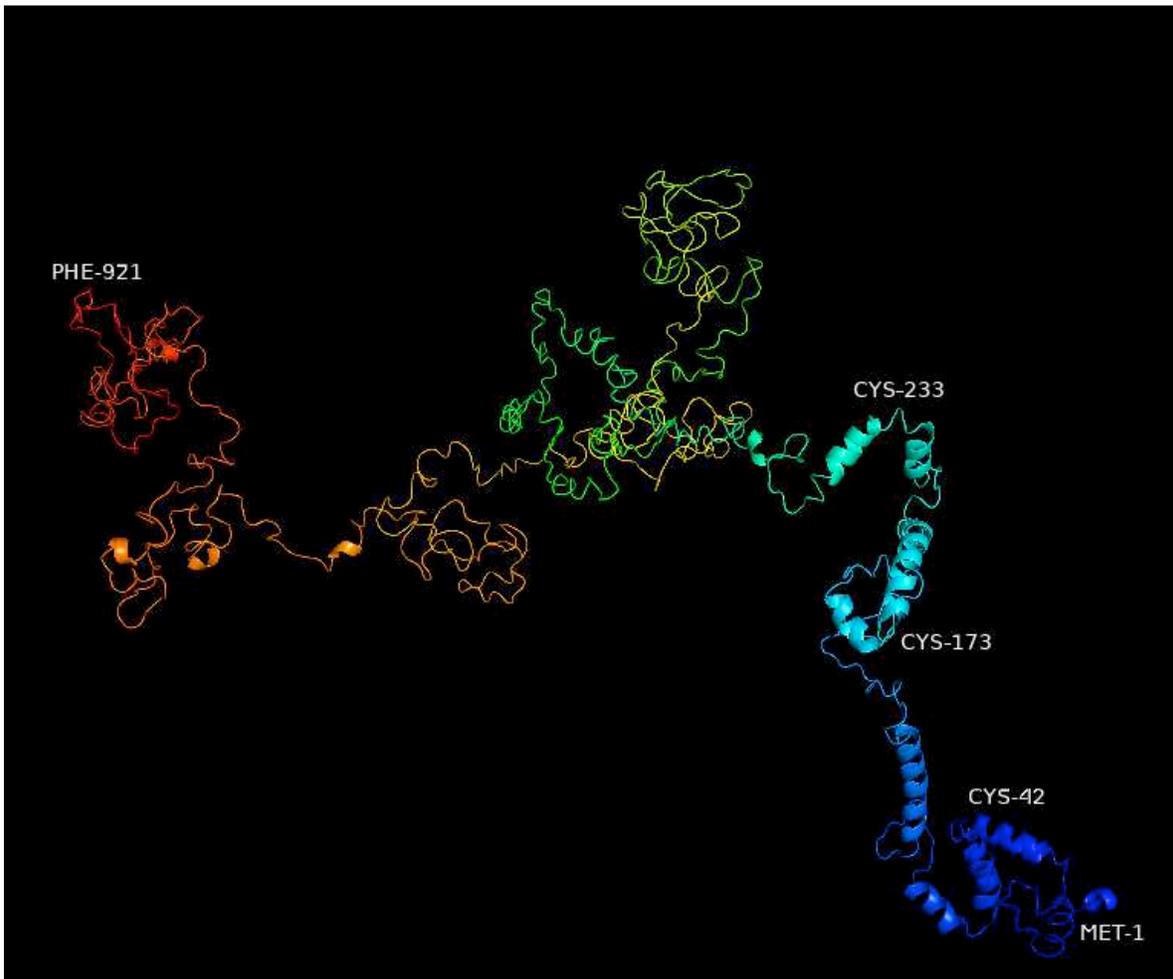
Información obtenida de la base de datos YEASTRACT. S: Sentido; A: Antisentido.

### Modelo por homología de la proteína Yap1

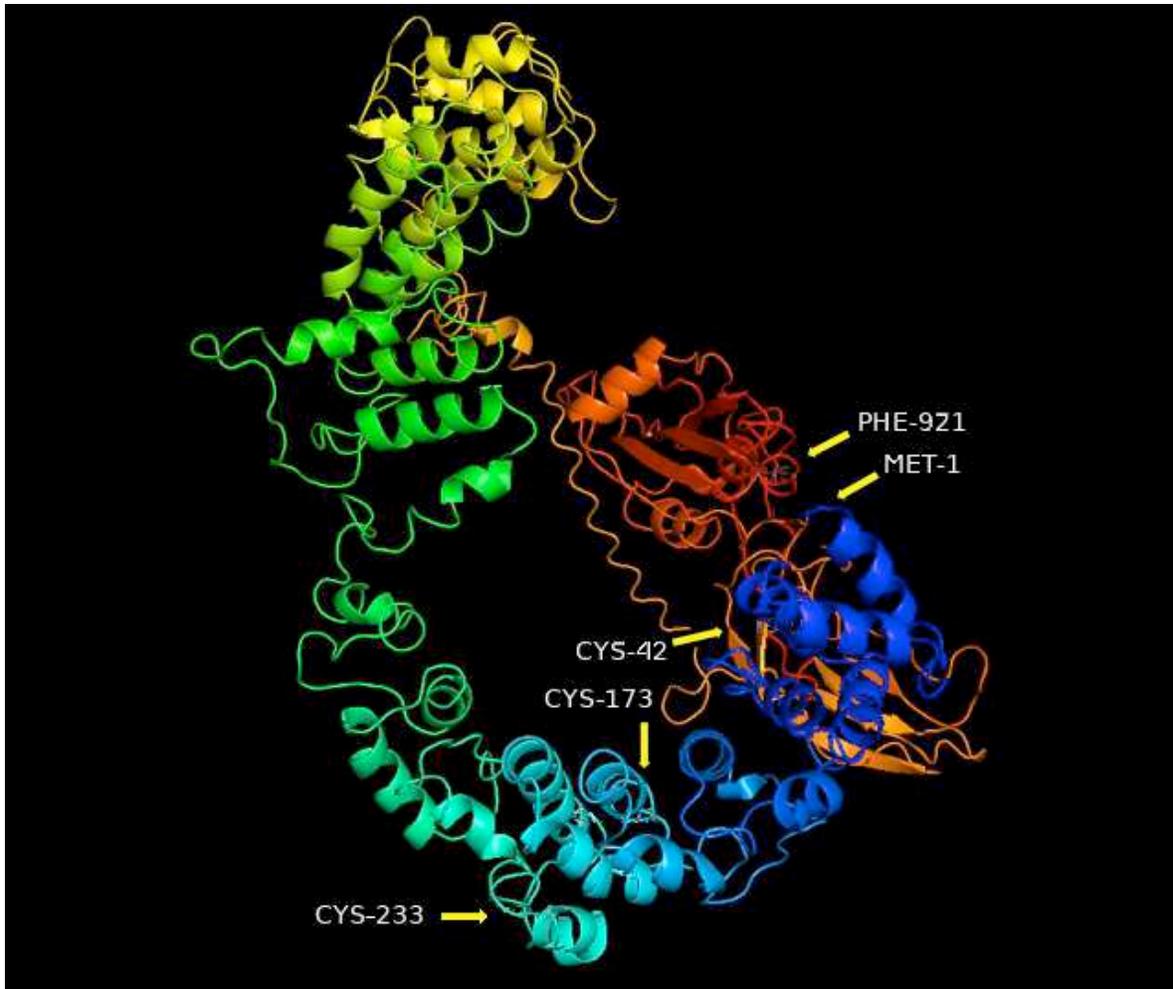
Se realizó el modelado por homología de la estructura tridimensional de la proteína Yap1 de *U. maydis*, para ello se utilizó el servidor I-TASSER (Zhang, 2009; Ambrish et al. 2012; Yang & Zhang, 2015) éste análisis se basó en predicciones de la estructura tridimensional pues a la fecha no existe la cristalografía de la proteína ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). El servidor arrojó cinco posibles modelos de la estructura de la proteína Yap1. Por simple observación dos modelos representan a la proteína “cerrada” y tres la forma “abierta”. Elegimos el mejor modelo en base al c-score, que es una medida que el mismo servidor proporciona para estimar la exactitud de los modelos, se considera un buen c-score cuando éste tiene un valor entre -5 y 2, sin embargo, entre más cercano sea a cero se considera que el modelo es el más aproximado a la realidad (Zhang, 2009; Ambrish et al. 2012; Yang & Zhang, 2015).

Los modelos ilustrados en las figuras 4 y 5, son los que tuvieron mejor c-score y que corresponden a un modelo “abierto” y a uno “cerrado” respectivamente. En condiciones normales es decir sin estrés, Yap1 se distribuye

entre el citoplasma y el núcleo, pero sobre todo se localiza en el citoplasma debido a su exportación activa desde el núcleo (Molina & Kahmann, 2007; Morano *et al.* 2012). A este tipo de conformación de Yap1 le llamamos modelo “abierto” o en su defecto podemos decir que la proteína se encuentra “inactiva”, ya que la célula no se encuentra en ningún tipo de estrés (Figura 4). Por otra parte, en presencia de estrés oxidativo se inicia el proceso de activación y como primer paso uno de los residuos de cisteína (Delaunay *et al.* 2000), que son los encargados de formar los puentes disulfuro por medio de su característico grupo tiol, junto con Gpx3 (peroxidasa dependiente de glutatión) se oxida a sulfóxido y este a su vez interactúa con un residuo de cisteína de Yap1, haciendo que cambie su conformación mediante la formación de dos enlaces disulfuro intramoleculares que activan a la proteína y enmascaran o cubren la secuencia de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés) (Lushchak, 2011; Morano *et al.* 2012), esto provoca que se acumule en el núcleo y active la expresión de genes específicamente involucrados en la respuesta a estrés oxidativo constituyendo esta transición al modelo al que hacemos referencia como proteína “cerrada” o “activa” (Figura 5) (Guo *et al.* 2011; Bleoanca *et al.* 2013; Diezmann, 2014), en la que se muestra claramente como cambia la conformación de la proteína Yap1, puesto que existen más hélices  $\alpha$ , en contraste con la estructura de la proteína señalada en la figura anterior.



**Figura 4. Estructura “abierta” o “inactiva” de la proteína Yap1 de *U. maydis*.** Se representa con los colores del arcoíris para indicar que la proteína inicia con metionina (Met) en el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y terminan con fenilalanina (Phe) en el grupo carboxilo (-COOH). Se indica la posición de los residuos de cisteína 42, 172 y 233.

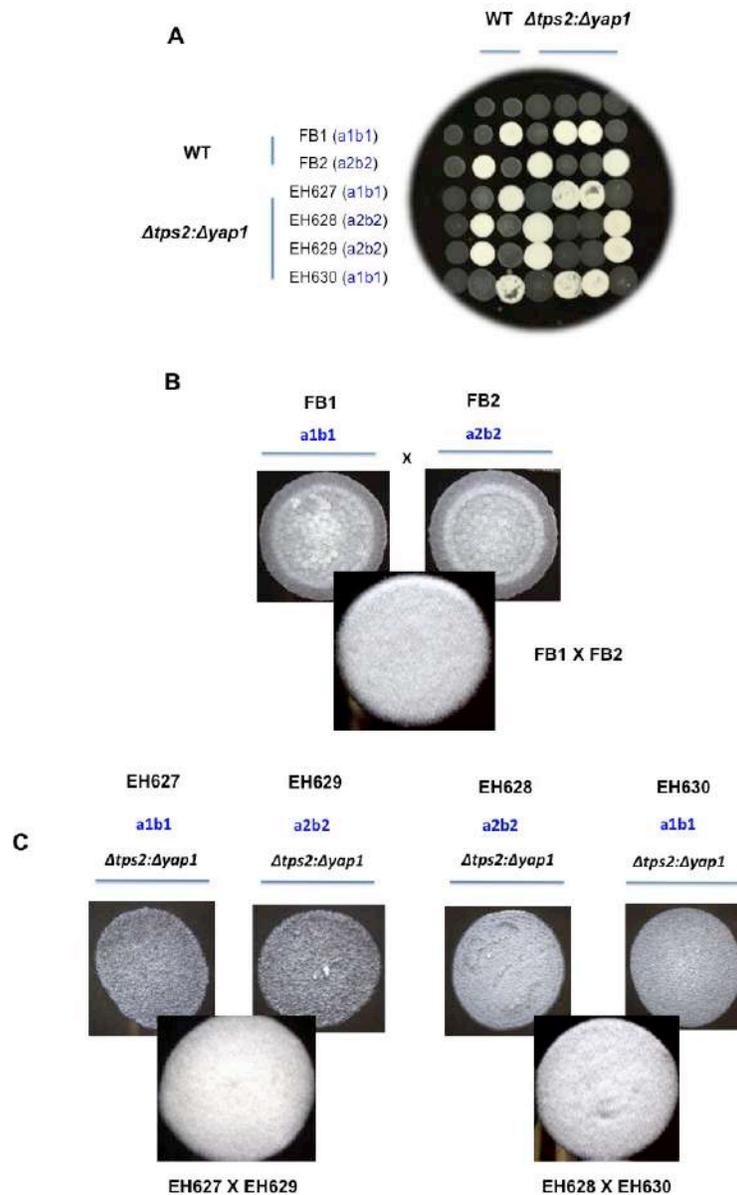


**Figura 5. Estructura “cerrada” o “activa” de la proteína Yap1 de *U. maydis*.** Se representa con los colores del arcoíris para indicar que la proteína inicia con metionina (Met) en el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y terminan con fenilalanina (Phe) en el grupo carboxilo (-COOH). Se indica la posición de los residuos de cisteína 42, 172 y 233.

### **Generación de las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$**

Para analizar la posible relación entre la síntesis de trehalosa y Yap1 ante respuesta a estrés y la patogenicidad en *U. maydis*, se obtuvieron las cepas dobles mutantes a partir de la germinación de las teliosporas producidas por la cruce de la cepa mutante  $\Delta tps2$  (234, *cbxR*, *a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>*) x la cepa  $\Delta yap1$  (520, *hygR*, *a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>*) en la planta de maíz. Se recuperaron cuatro cepas resistentes a ambos antifúngicos (carboxina e higromicina B). La transición dimórfica de *U. maydis*, ocurre durante el apareamiento de dos esporidias sexualmente compatibles y se puede

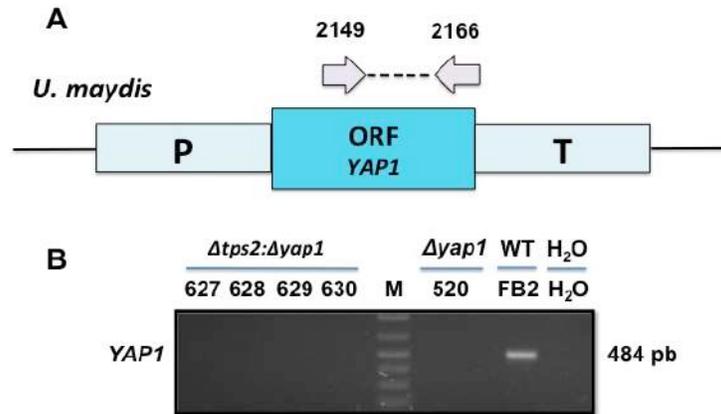
observar al mezclar dos cepas con esa característica en placas con medio MC sólido adicionado con carbón activado (Banuett & Herskowitz, 1989). Con esta prueba denominada “Reacción Fuz”, se verificó que la doble mutación no afectara el apareamiento (Figura 6. Panel A). Lo cual nos indica que se sigue formando la hifa dicariótica, que es la única forma en que *U. maydis* infecte y puede penetrar a la planta del maíz, para posteriormente desencadenar el proceso de la enfermedad. Las cepas silvestres sexualmente compatibles forman el micelio filamentoso que se identifica por ser de aspecto blanco algodonoso conocida como reacción fuz positiva, como se observa en las cepas silvestres (Figura 6. Panel B), mientras que aquellas que no se aparean, forman colonias de color grisáceo formadas por las levaduras (Figura 6). Así mismo, fue posible determinar el sexo de cada una de las dobles mutantes obtenidas y se identificó a las parejas sexualmente compatibles, para ser utilizadas posteriormente en las pruebas de patogenicidad. De esta manera se seleccionaron dos cepas dobles mutantes del sexo  $a_1b_1$  (EH627 y EH630) y dos cepas dobles mutantes del sexo  $a_2b_2$  (EH628 y EH629) (Figura 6. Panel C).



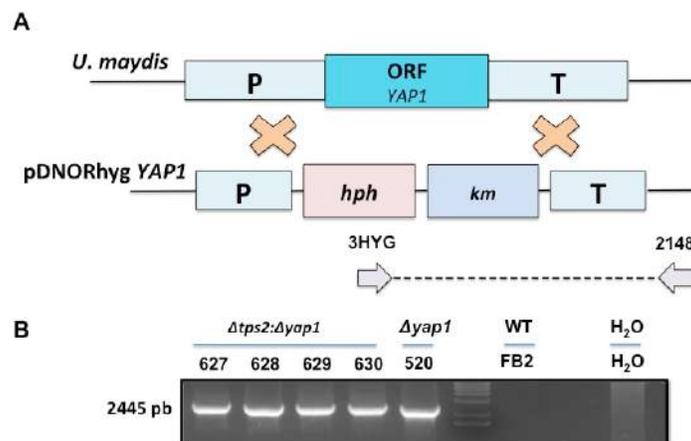
**Figura 6. Pruebas de apareamiento mediante reacción fuz.** Panel A, apareamiento de las cepas silvestres FB1 X FB2 y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  entre sí, para determinar el sexo de cada una de las dobles mutantes. Panel B, magnificación del apareamiento de las cepas silvestres FB1 X FB2. Las imágenes muestran la morfología cuando crecen de manera independiente. Panel C, magnificación de la reacción Fuz positiva de las cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Panel A, fotografías realizadas con una cámara digital CANON EOS REBEL T3i. Panel B y C, fotografías realizadas con el estereoscopio LEICA EZ4D. Las imágenes fueron procesadas con la aplicación Leica Acquire versión 3.4.1 para Mac OS X 10.9.

## Identificación molecular de las dobles mutantes

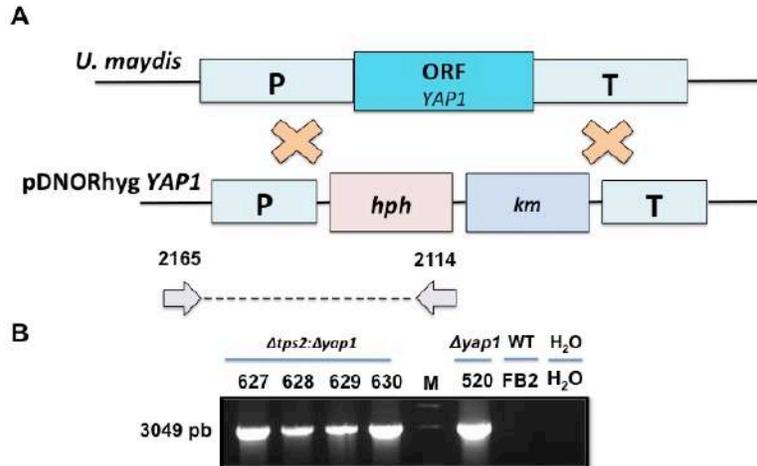
En seguida, se verificó mediante amplificación por PCR, la ausencia del marco de lectura abierto del gen *YAP1* (Figura 7). Como control se amplificó un fragmento de dicho gen en la cepa silvestre, con los oligonucleótidos específicos 2149 y 2166 que amplifican para un fragmento de 484 pb (Tabla 3). Las mutantes  $\Delta yap1$  que se utilizaron previamente para la obtención de las teliosporas cuentan con un cassette que sustituye al gen *YAP1* y contiene un gen denominado *HPH* que confiere resistencia a Higromina B y por lo tanto es utilizado como factor de selección. Para verificar si las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  cuentan con la inserción de dicho cassette se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento ubicado en el flanco derecho de dicho gen, en donde se utilizaron los oligonucleotidos 3HYG y 2148 que amplificaron un fragmento de 2445 pb (Figura 8). De la misma manera, se utilizaron los oligonucleotidos 2165 y 2114 que amplifican un fragmento de 3049 pb correspondiente al flanco izquierdo del mismo gen *HPH* para cerciorarnos que efectivamente cuentan con la inserción completa de dicho cassette (Figura 9). Posteriormente, para corroborar la ausencia del gen *TPS2* en las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  se realizó una amplificación por PCR. Previamente, sabemos que las mutantes  $\Delta tps2$  cuentan con un cassette que contiene los genes que confieren resistencia a carboxina (*cbx*) que se utilizan como factor de selección. Utilizamos los oligonucleotidos 1072 y 1721 que amplifican un fragmento de 1065 pb ubicado en el flanco derecho de dicho gen de resistencia (Figura 10). Así mismo, utilizamos los oligonucleotidos 1720 y 1071 que amplifican un fragmento de 1261 pb ubicado en el flanco izquierdo de dicho cassette que cuenta con el gen que confiere resistencia a carboxina (*cbx*) (Figura 11). Con estos datos concluimos a nivel molecular que obtuvimos cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  que como sustitución de los genes *TPS2* y *YAP1* cuentan con los genes de resistencia a antibióticos y que a su vez se utilizan como presión de selección.



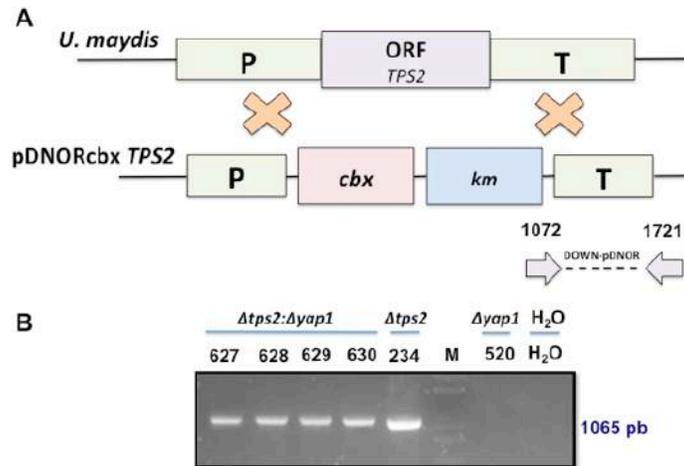
**Figura 7. Identificación de la mutación  $\Delta yap1$  por PCR.** Panel A, representación esquemática de la ubicación del marco de lectura abierto del gen *YAP1* y los sitios en donde los oligonucleótidos 2149 y 2166 amplifican 484 pb. Panel B, De izquierda a derecha cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , marcador de peso molecular de 100 pb, mutante  $\Delta yap1$ , silvestre FB2 (WT) y  $H_2O$ . Amplificación del gen *YAP1* sólo en la cepa silvestre FB2.



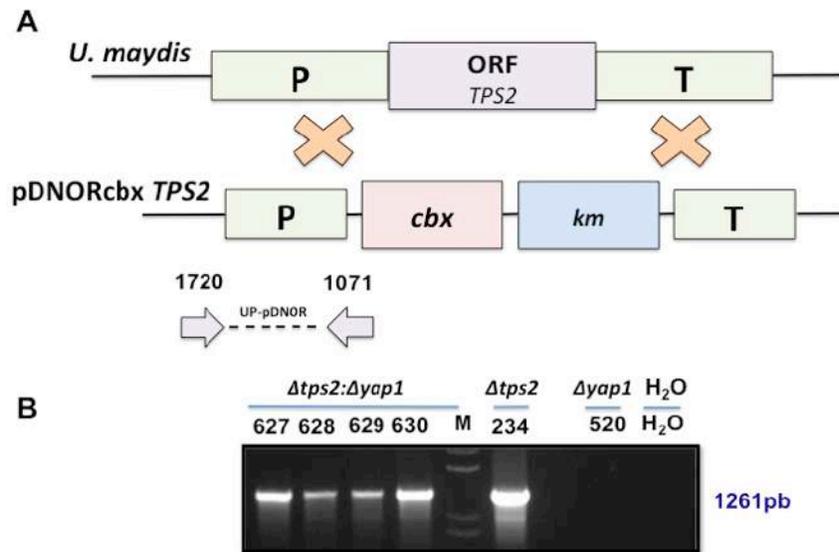
**Figura 8. Inserción del cassette que sustituye al gen *YAP1* por HPH por doble recombinación homóloga.** En el panel A, se muestra la representación esquemática del cassette que sustituye al gen *YAP1* por el gen *HPH* que confiere resistencia a higromicina B y la ubicación de los oligonucleótidos 3HYG y 2148 que amplifican 2445 pb. Panel B, de izquierda a derecha cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , mutante  $\Delta yap1$ , marcador de peso molecular de 1 Kb, silvestre FB2 (WT) y  $H_2O$ . Amplificación del flanco derecho del cassette en las cepas  $\Delta tps2::\Delta yap1$  y  $\Delta yap1$ .



**Figura 9. Inserción del cassette que sustituye al gen *YAP1* por *HPH*.** En el panel A, se muestra la representación esquemática del cassette que sustituye al gen *YAP1* por el gen *HPH* que confiere resistencia a Higromicina B y la ubicación de los oligonucleotidos 2165 y 2114 que amplifican 3049 pb. Panel B, de izquierda a derecha cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , marcador de peso molecular de 1 Kb, mutante  $\Delta yap1$ , silvestre FB2 (WT) y H<sub>2</sub>O. Amplificación del flanco izquierdo del cassette en las cepas  $\Delta tps2::\Delta yap1$  y  $\Delta yap1$ .



**Figura 10. Inserción del cassette que sustituye a *TPS2* por el gen que confiere resistencia a carboxina.** En el panel A, representación esquemática del cassette que sustituye a *TPS2* por CBX que confiere resistencia a carboxina y la ubicación de los oligonucleotidos 1072 y 1721 que amplifican 1065 pb. Panel B, de izquierda a derecha las cepas doble mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , mutante  $\Delta tps2$ , el marcador de peso molecular de 1 Kb, mutante  $\Delta yap1$  y H<sub>2</sub>O. Amplificación del flanco derecho del cassette en las cepas  $\Delta tps2::\Delta yap1$  y  $\Delta tps2$ .



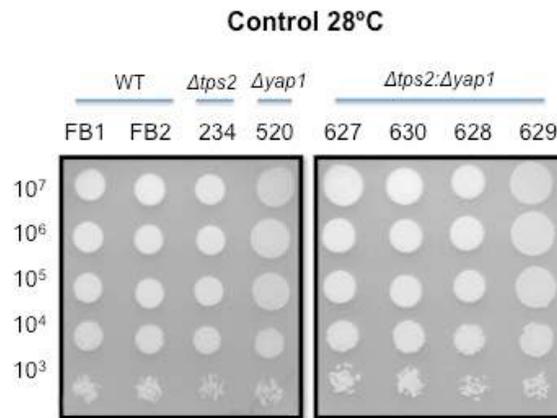
**Figura 11. Inserción del cassette que sustituye a *TPS2* por el gen que confiere resistencia a carboxina.** En el panel A, representación esquemática del cassette que sustituye a *TPS2* por CBX que confiere resistencia a carboxina y la ubicación de los oligonucleótidos 1720 y 1071 que amplifican 1261 pb. Panel B, de izquierda a derecha las cepas doble mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , marcador de peso molecular de 1 Kb, mutante  $\Delta tps2$ , mutante  $\Delta yap1$  y  $H_2O$ . Amplificación del flanco izquierdo del cassette en las cepas  $\Delta tps2::\Delta yap1$  y  $\Delta tps2$ .

## Análisis fenotípico

### Ensayo de respuesta a estrés *in vitro*

Debido a que en otras levaduras como en *Saccharomyces* y *Candida* se distribuye la funcionalidad entre las diferentes proteínas de la familia Yap. En donde específicamente en *S. cerevisiae* Yap1 es el regulador principal del estrés oxidativo, Yap2 en la respuesta a la presencia de cadmio (Merhej *et al.*, 2016), Yap4 y Yap6 están asociadas a la respuesta a estrés osmótico (Nevitt *et al.*, 2004), Yap1 junto con Yap5 en el metabolismo de algunos metales, como el hierro, Yap1 y Yap8 para la detoxificación de componentes de arsénico (Rodriguez-Pousada *et al.*, 2010; Merhej *et al.*, 2016). En contraste con lo que obtuvimos en nuestros resultados de análisis *in silico*, que indican la presencia de una sola proteína Yap1, la cuestión es si esta podría tener participación en la respuesta a otros tipos de estrés, además del oxidativo. Así como el fenotipo

desplegado en ausencia de la molécula de la trehalosa. Se analizó el fenotipo de las cepas de interés ante los distintos tipos de estrés, tal como el osmótico, oxidativo, daño a la pared celular, radiación UV y por la presencia de metales pesados. Se analizó el crecimiento de cada una de las cepas silvestres FB1 y FB2; mutante  $\Delta tps2$  (234) y  $\Delta yap1$  (520); dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  EH627, EH628, EH629 y EH630 (Figura 12). Como control se utilizó MM7 sin agente estresante incubadas a 28°C durante 72 horas.



**Figura 12. Crecimiento en condiciones estándar sobre MM7 sin agente estresante.** Cepas FB1 y FB2, mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las cuatro dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las filas corresponden a las diluciones sembradas. Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

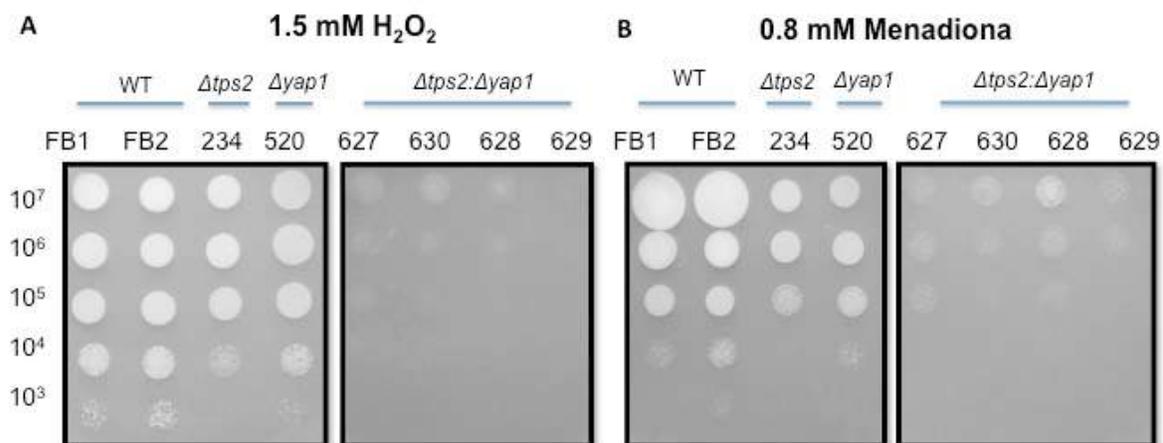
### **Las cepas dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$ son altamente sensibles al estrés oxidativo**

Se sabe que los agentes estresantes actúan de diversas maneras de acuerdo a sus propiedades químicas, en el caso de la menadiona, ésta produce aniones superóxidos dentro de la célula, así mismo el  $H_2O_2$  genera diferentes especies reactivas de oxígeno dentro de la célula (Gasch *et al.* 2000; Herdeiro *et al.* 2006). Por otra parte en el caso del *tert*-butilhidroperóxido, éste es un peróxido orgánico que ataca preferencialmente a la membrana plasmática (Herdeiro *et al.* 2006). Durante el estrés oxidativo, los lípidos que forman la membrana celular, son las principales moléculas blanco de las ROS a través de las reacciones de Fenton,

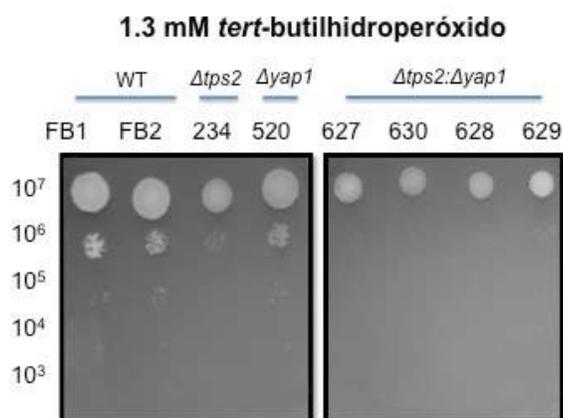
situación denominada peroxidación lipídica, que a menudo conduce a la pérdida de la función de la membrana. Esto puede causar que permeen indiscriminadamente metabolitos indeseables a través de ésta estructura (Ribeiro *et al.*, 2015) o bien que salgan componentes. De manera general, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  fueron particularmente sensibles a la presencia de  $H_2O_2$  (Figura 13. Panel A) y menadiona (Figura 13. Panel B). En *F. graminearum* se demostró que la mutación de *YAP1* afectó el crecimiento del hongo en  $H_2O_2$  y en *M. oryzae* el crecimiento radial y la conidiación (Guo *et al.* 2011; Montibus *et al.* 2013). Cabe resaltar que la mutante  $\Delta tps2$  es aún más sensible al estrés oxidativo en contraste con la mutante  $\Delta yap1$ , lo que sugiere que la síntesis de trehalosa tiene una función más importante aún en la resistencia a este tipo de estrés. Sin embargo, las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  resultaron ser más sensibles que las anteriores al  $H_2O_2$  (Figura 13. Panel A) y la menadiona (Figura 13. Panel B). Sugiriendo un efecto aditivo generado por la doble mutación. Por otro lado, las cepas silvestres FB1 y FB2, así como las cepas mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$ , mostraron la mayor sensibilidad al *tert*-butilhidroperóxido al igual que las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  (Figura 14).

Finalmente, para concluir los ensayos de respuesta a estrés oxidativo *in vitro*, analizamos la respuesta de la colección de cepas ante rosa de bengala crecidas en oscuridad y en luz (Figura 15). El rosa de bengala (RB; di-sodio 4,5,6,7-tetracloro-2,3,5,7-tetrayodofluoresceína) es un pigmento fotoreactivo que produce oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) cuando es expuesto a la luz. Entonces el RB puede causar daño oxidativo debido a la producción de las ROS cuando el medio es expuesto a la luz (Chilvers *et al.*, 1999). Es por esta razón que se sugiere crecer las cepas en ambas condiciones. En condición de luz, las cepas mostraron un fenotipo muy similar, siendo altamente sensibles. Se observaron ligeras diferencias entre las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  que tienen fondo genético  $a_2b_2$  con respecto a las que tienen fondo genético  $a_1b_1$  (Figura 15. Panel A). En cambio, en la condición de oscuridad ante este mismo agente estresante, en general las cepas fueron más resistentes que las que estuvieron expuestas a la luz. En este sentido las cepas silvestres y las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  mostraron ser más

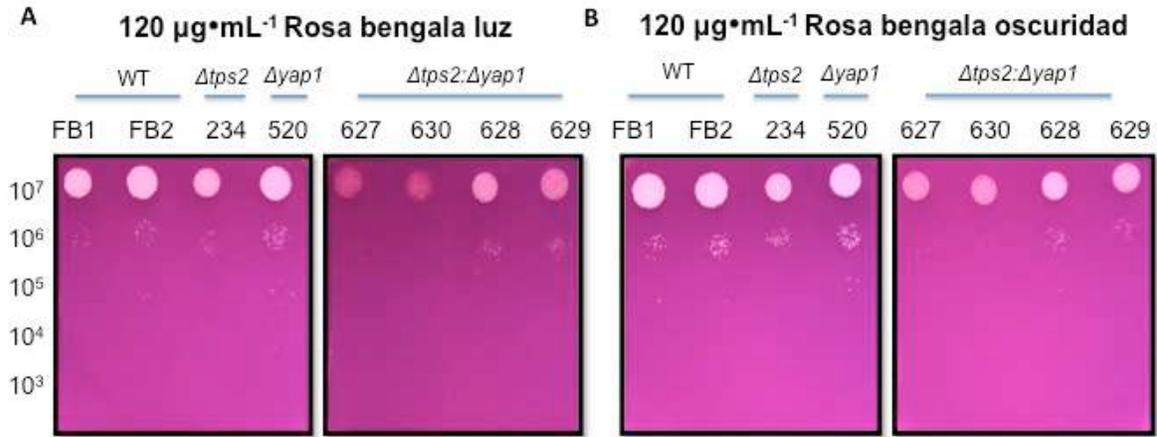
resistentes en contraste con las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  (Figura 15. Panel B). Esto nos indica que la fototoxicidad inducida por el RB en luz si generó daño oxidativo en las cepas tanto silvestres como en la ausencia de ambos genes *YAP1* y *TPS2*.



**Figura 13. Respuesta a estrés oxidativo.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.



**Figura 14. Respuesta a estrés oxidativo.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con *tert*-butilhidroperóxido. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

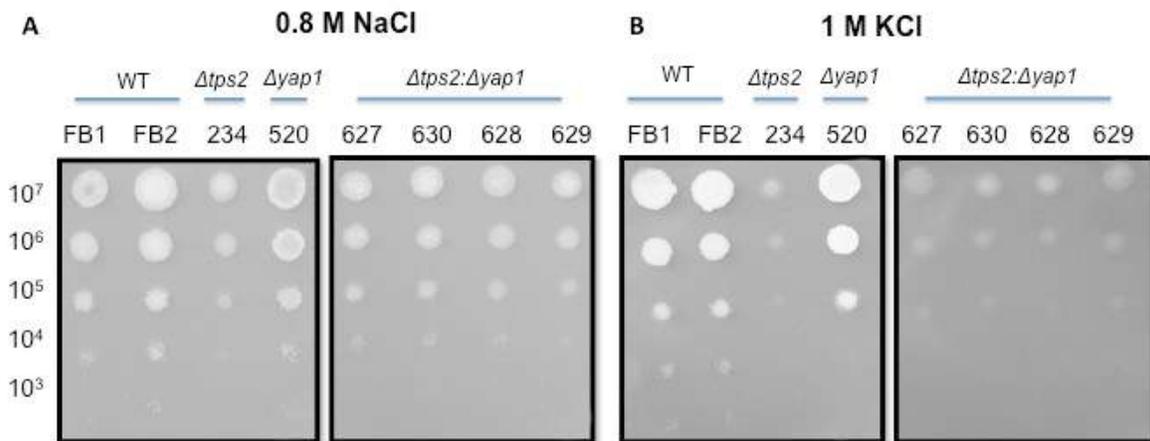


**Figura 15. Respuesta a estrés oxidativo.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con Rosa Bengala expuesto a luz y oscuridad. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### El estrés osmótico no altera el crecimiento de las mutantes $\Delta yap1$

Se entiende que por estrés osmótico ocurren cambios en la concentración de solutos en el entorno de la célula. Por lo que analizamos la respuesta de las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  así como las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  en contraste con las cepas silvestres. Utilizamos 0.8 M NaCl (cloruro de sodio) y 1 M KCl (cloruro de potasio). En general, las cepas silvestres FB1 y FB2 así como las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$ , mostraron sensibilidad al NaCl al igual que las cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  (Figura 16. Panel A). Sabemos que la participación de *UmTPS2* es indispensable para la tolerancia al estrés osmótico generado por estos agentes que alteran el balance osmótico (Cervantes *et al.* 2016). Por lo que las mutantes  $\Delta tps2$  en este ensayo se vieron muy afectadas. Sin embargo, también nos cuestionamos si *UmYAP1* participa en la tolerancia al estrés osmótico. La mutante  $\Delta yap1$  presentó un fenotipo muy similar a las cepas silvestres (Figura 16. Paneles A y B). En el caso del KCl, las cepas mutantes  $\Delta tps2$  fueron particularmente más sensibles a este agente estresante (Figura 16. Panel B). En contraste, con las mutantes  $\Delta yap1$  que resultó ser mucho más resistente. En el caso de las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  observamos que tanto

con el NaCl como con el KCl mostraron sensibilidad. Sin embargo, por los fenotipos observados con las cepas mutantes simples, podemos darnos cuenta que se ven afectadas por la ausencia de *UmTPS2* y un poco por la ausencia de *UmYAP1*, lo cual este dato nos sugiere que la síntesis de trehalosa efectivamente tiene un papel relevante para la tolerancia al estrés osmótico (Figura 16. Paneles A y B).

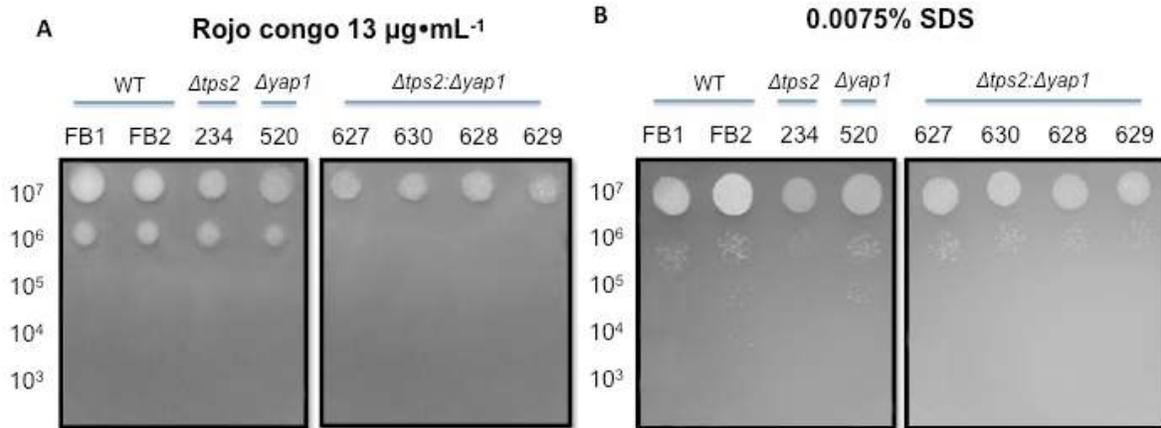


**Figura 16. Respuesta a estrés osmótico.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con NaCl y KCl. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

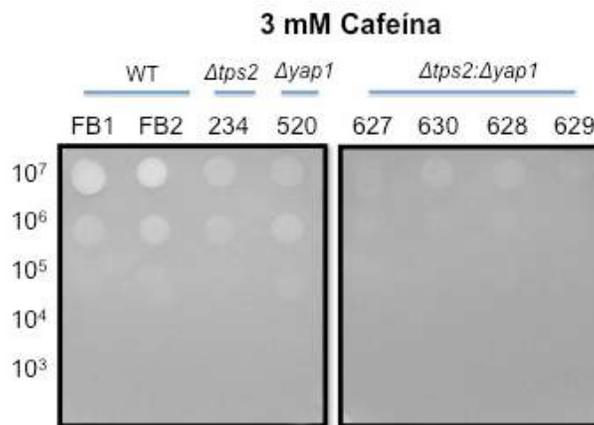
### **El estrés de pared celular afecta la sensibilidad en las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$**

El rojo congo es un agente que interfiere con el ensamblaje de la pared celular de los hongos al unirse a la quitina y los  $\beta$ -1,4-glucanos (Chi *et al.*, 2009). Tanto en las levaduras como en los hongos filamentosos la quitina contribuye significativamente a la resistencia mecánica de la pared celular (Ram *et al.*, 2004). En este contexto, el SDS (sodium dodecyl sulfate, por sus siglas en inglés) es un detergente que induce el estrés de la pared celular afectando su integridad a través de la perturbación de la membrana celular (Ram *et al.*, 2004; Langner *et al.*, 2015). En donde puede solubilizar la membrana y sobre todo cambia la

conformación de algunas proteínas y logra que éstas se separen (Garcera *et al.*, 2003). Para estudiar el efecto que tienen en las mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  estos agentes estresantes, que sabemos que generan disturbios en la biosíntesis de la pared celular, activando cambios compensatorios en la arquitectura de la misma, mediante la ruta de señalización de estrés de la pared celular o integridad celular (Levin, 2011). Retamos a las cepas con  $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rojo congo en donde observamos que las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  mostraron mayor sensibilidad a este agente (Figura 17. Panel A). Este resultado, nos indica que la participación del gen *TPS2* es esencial, así como el gen *YAP1* y que además están altamente relacionados entre sí, ya que, en ausencia de uno, la participación y función del otro se vuelve fundamental de manera compensatoria (Figura 17. Panel A). Para profundizar el análisis, también retamos a las cepas con el detergente SDS a 0.0075% de concentración, aquí observamos que las cepas silvestres y la mutante  $\Delta yap1$  se comportan muy parecidas, mientras que el fenotipo de las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  es como el de las mutantes  $\Delta tps2$ . El fenotipo observado nos sugiere que la trehalosa es la molécula principal encargada de proteger a las células ante este detergente (Figura 17. Panel B). Por otra parte, también analizamos la respuesta de las cepas ante la cafeína. La cafeína se utiliza como un criterio fenotípico para evaluar la función de la vía de integridad de la pared celular mediada por cinasas en *S. cerevisiae* (Kuranda *et al.*, 2006). Esto se debe a que la mayoría de las mutantes que son defectuosas en los componentes de la vía de la integridad de la pared celular son sensibles a la cafeína (Park *et al.*, 2005; Kuranda *et al.*, 2006). En general, todas las cepas mostraron hipersensibilidad a esta condición de estrés (3mM cafeína). No obstante, las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  fueron incapaces de mostrar crecimiento alguno, seguidas de las mutantes simples (Figura 18. Panel A).



**Figura 17. Respuesta a estrés de pared celular.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con agentes rojo congo y SDS. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes *Δtps2* y *Δyap1* y las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1*. Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

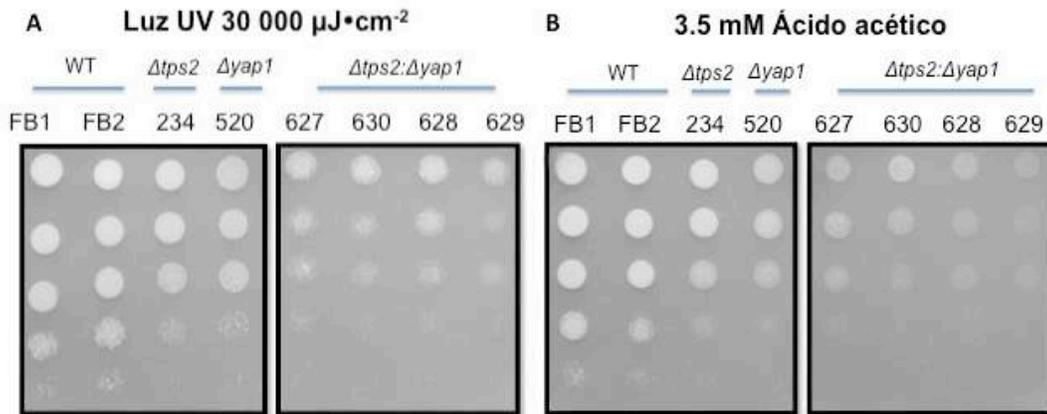


**Figura 18. Respuesta a estrés de pared celular.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con agentes cafeína. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes *Δtps2* y *Δyap1* y las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1*. Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### La participación de Yap1 junto con la trehalosa es esencial para la tolerancia a la radiación por luz UV y pH ácido

Cuando las cepas fueron retadas con radiación UV, expuestas a 30 000  $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  en la respuesta de las mutantes *Δtps2* y *Δyap1* podemos apreciar que el

daño generado por la radiación UV es similar en ambas mutaciones. Sin embargo, las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  mostraron menos tolerancia que las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$ . Este dato, nos señala que ante la exposición a la luz UV, la cuál genera daño al ADN, los genes *UmYAP1* y *UmTPS2* tienen una participación en conjunto para la viabilidad ante esta situación de estrés *in vitro* (Figura 19. Panel A). En respuesta al ácido acético *in vitro*, volvemos a observar el mismo fenotipo de la participación de Yap1 en conjunto con la trehalosa, en donde la ausencia de uno puede ser compensado por la presencia del otro como mecanismo de defensa y lo vemos con la reducción de la tolerancia a este agente en la doble mutación  $\Delta tps2::\Delta yap1$  (Figura 19. Panel B).

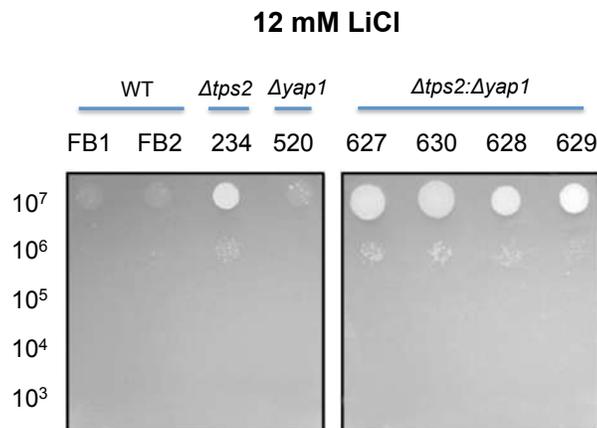


**Figura 19. Daño por radiación UV y ácido acético.** Crecimiento sobre MM7 con exposición a luz UV y ácido acético. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### El crecimiento en las cepas $\Delta tps2$ y $\Delta tps2::\Delta yap1$ es favorecido en estrés salino

Para realizar el análisis del fenotipo ante el estrés salino, se utilizó como agente estresante el cloruro de litio (LiCl). Por lo que, se examinó la respuesta de las cepas con diferentes concentraciones de este agente, desde 10 mM, 11 mM y 12 mM LiCl. De acuerdo con estas concentraciones, encontramos diferencias

notorias con la última concentración, es decir a 12 mM LiCl. En general, las cepas silvestres FB1 y FB2 y la mutante  $\Delta yap1$ , mostraron ser altamente sensibles dado que no hubo crecimiento. Sin embargo, observamos que la mutante  $\Delta tps2$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  resultaron ser mucho más resistentes que las anteriores (Figura 20). Este resultado, sugiere que la resistencia de las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  a este tipo de estrés se debe a la ausencia del gen *TPS2*. El fenotipo observado demuestra que el crecimiento es favorecido con ausencia del gen *TPS2*, ante la respuesta al estrés salino generada por el cloruro de litio. En el que quizás, como un mecanismo de defensa ante esta situación de estrés generada por un agente altamente tóxico para las células, es inducir la muerte celular en las cepas silvestres.



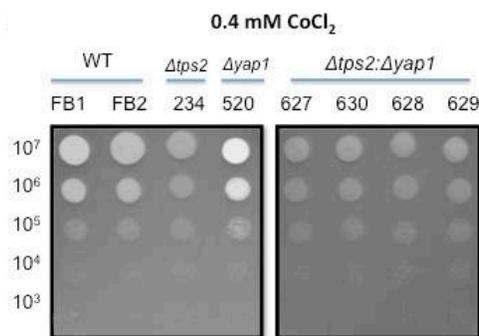
**Figura 20. Respuesta a estrés salino.** Crecimiento sobre MM7 suplementado con LiCl. De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas después de 72 horas de incubación a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### ***UmYAP1* y *UmTPS2* no son esenciales para tolerar la presencia de metales pesados**

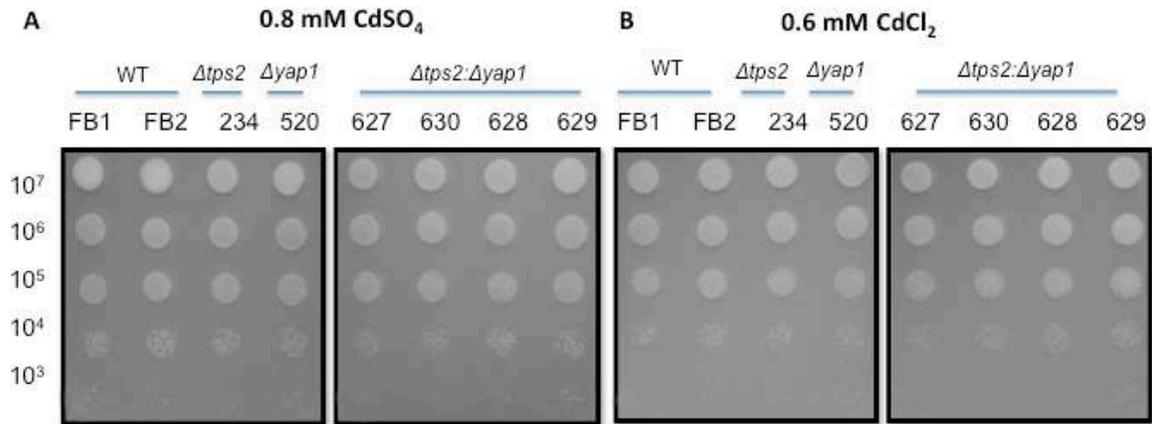
La toxicidad del cobalto consiste en la capacidad que tienen los iones del cobalto para generar las ROS (Simonsen *et al.*, 2012). En nuestro equipo de trabajo nos cuestionamos si las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y

*Δyap1* y las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1* mostrarían sensibilidad o diferencias en el crecimiento ante la presencia de cobalto. Para esto, realizamos ensayos *in vitro* con este agente estresante con 0.4 mM de  $\text{CoCl}_2$  y observamos que no hay diferencias en el crecimiento entre ninguna de las cepas (Figura 21). Sin embargo, sí notamos que la resistencia a este metal es a una concentración muy baja ya que a concentraciones mayores a 0.4 mM de  $\text{CoCl}_2$  ninguna de las cepas creció. El  $\text{CoCl}_2$  en bajas concentraciones genera condiciones similares a la hipoxia (Kretschmer *et al.*, 2018). Siendo 0.4 mM  $\text{CoCl}_2$  la concentración máxima que todas las cepas, de acuerdo con nuestros resultados son capaces de tolerar (Figura 21).

Ahora bien, por otro lado se encuentra el cadmio que, induce a la formación de ROS y de nitrógeno (Huang *et al.*, 2006; Caetano *et al.* 2015). En nuestros ensayos, observamos el mismo fenómeno que ocurrió con el cobalto, en el cual todas las cepas mostraron la misma sensibilidad en las concentraciones a 0.8 mM  $\text{CdSO}_4$  (Figura 22.A) y 0.6 mM  $\text{CdCl}_2$  (Figura 22.B) que son relativamente bajas. Este dato nos indica que el cadmio es altamente tóxico para *U. maydis*. Asimismo, que los mecanismos de defensa presentados por el factor de transcripción Yap1 y la trehalosa no son suficientes para proteger a las células contra éste agente estresante en concentraciones mayores a las analizadas.



**Figura 21. Respuesta a estrés por presencia de metales pesados. Crecimiento sobre MM7 suplementado con  $\text{CoCl}_2$ .** De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes *Δtps2* y *Δyap1* y las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1*. Las placas fueron fotografiadas a las 72 horas después de haber sido incubadas a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.



**Figura 22. Respuesta a estrés por presencia de metales pesados. Crecimiento sobre MM7 suplementado con agentes  $\text{CdSO}_4$  y  $\text{CdCl}_2$ .** De izquierda a derecha, las cepas silvestres FB1 y FB2, las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Las placas fueron fotografiadas a las 72 horas después de haber sido incubadas a 28°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

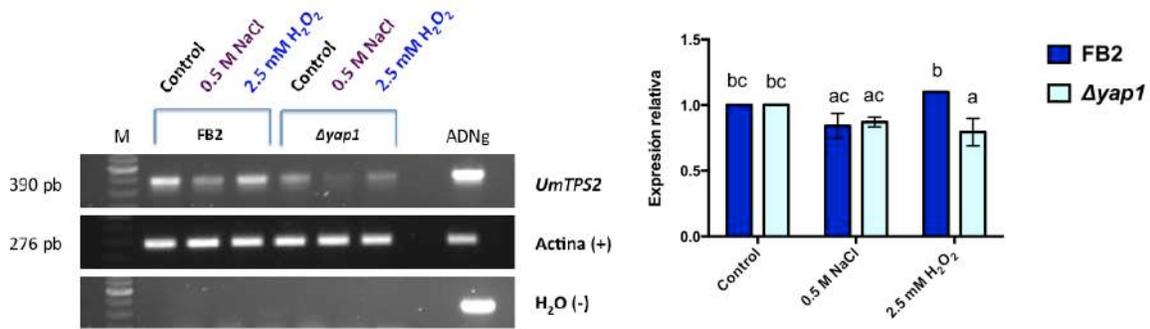
**Tabla 6. Sensibilidad relativa de cepas de *U. maydis* ante diferentes condiciones de estrés.**

ESTRÉS	FB1	FB2	$\Delta tps2$	$\Delta yap1$	$\Delta tps2::\Delta yap1$
Control	100	100	100	100	100
$\text{H}_2\text{O}_2$	100	100	60	80	20
Menadiona	80	80	60	80	20
<i>tert</i> -butilhidroperóxido	40	40	40	40	20
Rosa bengala luz	20	20	20	20	20
Rosa bengala oscuridad	30	30	30	30	20
NaCl	80	80	60	80	60
KCl	80	80	20	60	20
Rojo congo	40	40	40	40	20
SDS	40	40	40	40	30
Cafeína	40	40	30	30	10
Luz UV	80	80	70	70	60
Ácido acético	80	80	70	70	60
LiCl	20	20	40	20	40
$\text{CoCl}_2$	70	70	70	70	70
$\text{CdCl}_2$	80	80	80	80	80
$\text{CdSO}_4$	90	90	90	90	90

La sensibilidad del estrés para cada agente estresante, se cuantificó el porcentaje de crecimiento en relación con el correspondiente control sin estrés, de acuerdo con Nikolaou *et al.*, 2009.

## Yap1 regula la expresión de *UmTPS2*

Gounalaki & Thireos en 1994, mencionaron que posiblemente existía una relación entre la trehalosa y el factor de transcripción Yap1 en *S. cerevisiae* puesto que la expresión de *TPS2* podría ser regulada por Yap1. Más adelante Bleoanca *et al.* (2013) retoma la misma idea y obtiene en sus resultados que la mutante  $\Delta yap1$  acumula niveles de trehalosa más bajos y que este podría regular parcialmente la expresión de *TPS1*. Con base a estos antecedentes examinamos los niveles del transcrito de *TPS2*, y encontramos que hay una disminución en la expresión de este gen en ausencia del gen maestro *YAP1* cuando las células son sometidas a una condición de estrés oxidativo con 2.5 mM  $H_2O_2$  (Figura 23). Observamos que en la condición control (sin estrés) la expresión de *TPS2* en la cepa silvestre FB2 y en la mutante  $\Delta yap1$  no mostró diferencias entre sí. Así mismo, en la cepa silvestre con respecto a la mutante  $\Delta yap1$  tampoco encontramos diferencias significativas en el tratamiento con 0.5 M NaCl que induce estrés osmótico. Sin embargo, cuando el estrés impuesto fue oxidativo (2.5 mM  $H_2O_2$ ), sí observamos diferencias significativas, en donde en la cepa silvestre FB2 el nivel de expresión de *TPS2* se incrementó respecto a la mutante  $\Delta yap1$  en comparación con las condiciones control y de estrés osmótico, tanto de la cepa parental FB2 como de la mutante  $\Delta yap1$ . Este dato nos sugiere que en *U. maydis* la presencia de peróxido induce la expresión del gen *TPS2*, lo cual puede conllevar a que la cepa acumule más trehalosa como mecanismo de defensa. Cabe recordar que en el promotor de *TPS2*, no se encontró un sitio de unión a Yap1, por lo que será necesario realizar estudios funcionales que demuestren cual es la secuencia consenso de unión al ADN de Yap1 en *U. maydis*.

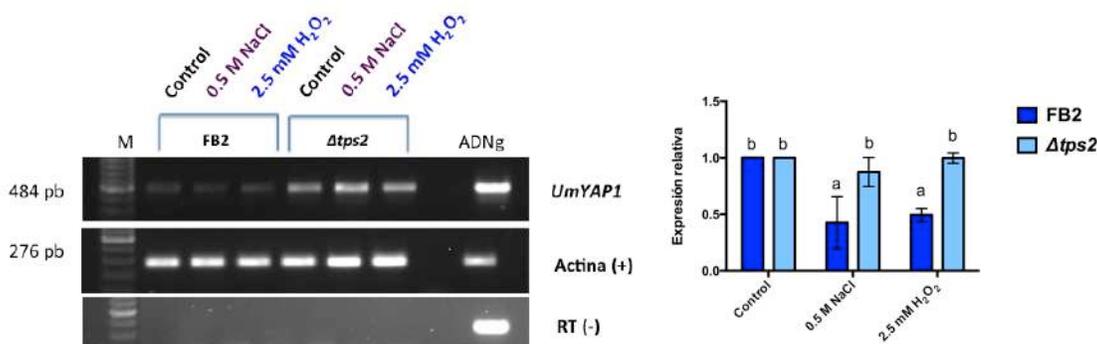


**Figura 23. Expresión de *UmTPS2* en las cepas silvestres FB2 y mutantes  $\Delta yap1$ .** Expresión del gen constitutivo actina en las cepas silvestres y mutantes  $\Delta yap1$ , el último gel es sin transcriptasa reversa (RT) como control. Las muestras de ARN fueron extraídas a partir de cultivos crecidos en MM7, control sin agente estresante, estrés osmótico 0.5 M NaCl y estrés oxidativo 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Marcador de peso molecular de 100 pb. ANOVA de dos vías,  $P=0.0006$ ,  $F=14.56$ ,  $DF=2$ . Los experimentos se realizaron por triplicado.

### La expresión de *YAP1* aumenta en las mutantes $\Delta tps2$ en respuesta al estrés osmótico y oxidativo

Una vez que observamos que en ausencia de *YAP1* se ve afectada la expresión de *TPS2*, nos cuestionamos si al invertir las mutantes observaríamos un efecto similar, esto como una respuesta para responder de una manera adecuada al estrés. Puesto que Yap1 es el encargado de la activación de genes detoxificadores, considerando que las mutantes  $\Delta tps2$  son extremadamente sensibles al estrés oxidativo y al osmótico (Figura 24). En este caso encontramos que hay una sobreexpresión del gen *YAP1* en ausencia del gen *TPS2* cuando las células son expuestas a 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.5 M NaCl respectivamente (Figura 24). Puesto que la expresión de *YAP1* en la cepa silvestre FB2 y en la mutante  $\Delta tps2$  no mostró diferencias en la condición de control. En donde el efecto que vemos es que en la cepa parental FB2 en presencia de 0.5 M NaCl y 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el mecanismo de defensa por parte *U. maydis* no es regulado por *YAP1*, al menos no a nivel transcripcional, puesto que los niveles de expresión se mantienen bajos, pero cuando está ausente el gen *TPS2*, los niveles de expresión de *YAP1* se elevan (Figura 24). Este fenómeno sugiere una posible co-regulación entre estos

dos genes. El cual puede actuar como mecanismo de defensa que compensa la ausencia de *TPS2* en el cual el hongo activa la acumulación de Yap1 en el núcleo como mecanismo para resistir el estrés.



**Figura 24. Expresión de *YAP1* en las mutantes  $\Delta tps2$ .** Las cepas se crecieron en MM7 sin agente estresante como control, 0.5 M NaCl y 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante tres horas de incubación. ANOVA de dos vías,  $p=0.0038$ ,  $F = 9.196$ ,  $DF=2$ .

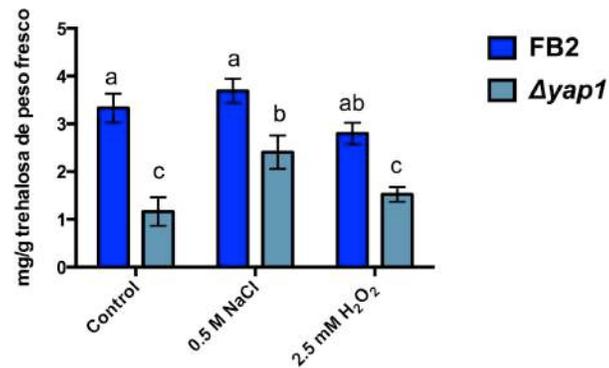
### Las mutantes $\Delta yap1$ acumulan menor cantidad de trehalosa en estrés osmótico y oxidativo

Para determinar si la síntesis de trehalosa se ve afectada en las mutantes  $\Delta yap1$ , en comparación con la cepa silvestre FB2 y establecer una relación entre la trehalosa y Yap1, con base a lo observado a la expresión de *TPS2* cuantificamos la trehalosa por HPLC. Las células se trataron con 0.5 M NaCl (estrés osmótico) y 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (estrés oxidativo) en un periodo de 3 horas en MM7 y se comparó contra células sin agente estresante.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos, existe una disminución significativa en la concentración de trehalosa en la cepa mutante  $\Delta yap1$  en comparación con la cepa silvestre FB2, con una diferencia de 1.277 mg/g de trehalosa (Figura 25). En promedio la concentración de trehalosa en las cepas silvestres expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 2.798 mg/g, mientras que en la mutante  $\Delta yap1$  fue de 1.521 mg/g. La concentración de trehalosa de las células expuestas a estrés

osmótico en las cepas silvestres fue de 3.690 mg/g y en la mutante  $\Delta yap1$  fue de 2.407 mg/g, con una diferencia de 1.282 mg/g de trehalosa (Figura 25).

Estos resultados sugieren que la síntesis de trehalosa parece estar regulada por el factor de transcripción Yap1, ya que en su ausencia disminuye la concentración de la misma. Esta regulación podría ser a nivel de la activación transcripcional de enzimas que degradan la trehalosa o bien vía represión de los genes involucrados en la síntesis de éste disacárido. Retomando nuestros resultados *in silico*, en donde identificamos que los sitios de unión al ADN de Yap1 se encontraron en el promotor de *TPS1* pero no en el de *TPS2*. Sin embargo, cabe resaltar que *TPS1* también es parte de la ruta de síntesis de la trehalosa en *U. maydis*. Mientras que en la levadura *S. cerevisiae* la expresión de *TPS2* está regulada por Yap1 (Gounalaki & Thireos, 1994) y la expresión de *TPS1* también es regulada parcialmente por Yap1 (Bleoanca *et al.*, 2013).

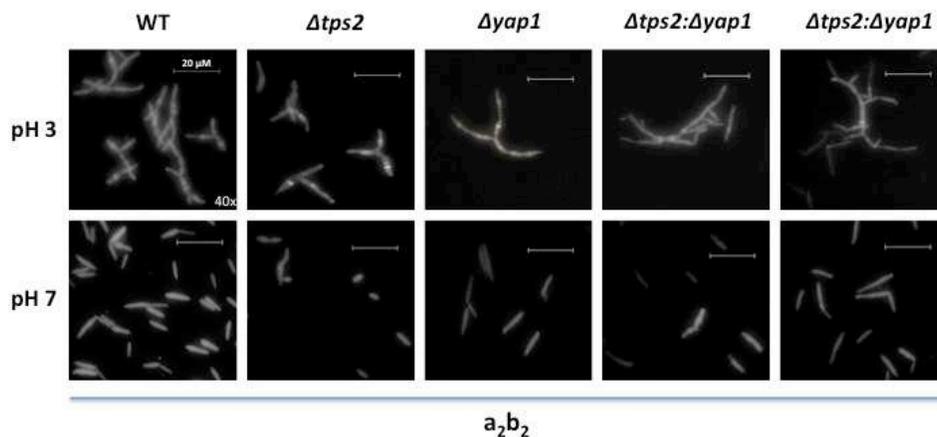


**Figura 25.** Cuantificación de la concentración de trehalosa en la cepa silvestre FB2 y la mutante  $\Delta yap1$ . La cuantificación de trehalosa se realizó en cepas que crecieron en MM7 sin agente estresante como control, 0.5 M NaCl y 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante tres horas de incubación.  $p=0.0215$ ,  $F = 5.377$ ,  $DF=2$ .

### La transición dimórfica de *U. maydis* se ve afectada en las mutantes $\Delta tps2$

El dimorfismo es el proceso de diferenciación celular en el que un hongo que crece en forma de levadura, cambia radicalmente a la forma de crecimiento micelial, o viceversa en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo (Ruíz-Herrera & León-Ramírez, 2012). Para observar la transición dimórfica de *U.*

*maydis* seguimos las condiciones reportadas por Ruiz-Herrera *et al.* en 1995, por control y cambio del pH en el medio de cultivo. Observamos que *U. maydis* crece en forma de micelio a pH ácido con un óptimo cercano a pH 3, y crece en forma de levadura a un pH cercano a la neutralidad con un óptimo de pH 7. Seleccionamos a la cepa silvestre FB2, así como las mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ ; todas con fondo genético  $a_2b_2$  (Figura 26). Este experimento es una aproximación de lo que puede ocurrir en *U. maydis* en la naturaleza y nos permite observar su comportamiento en condiciones de laboratorio. Así mismo, revela el efecto de las mutaciones de los genes en cuestión, si interfieren o no en la transición dimórfica del hongo. Las mutantes  $\Delta yap1$  y  $\Delta tps2::\Delta yap1$  crecieron de manera esperada en forma de levadura en el MM7 respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, cabe recalcar que en las mutantes  $\Delta tps2$ , las levaduras fueron más cortas y ovoides que las silvestres. Por otra parte, en cuanto al crecimiento en MM pH ácido, el crecimiento de las mutantes  $\Delta tps2$  mostró diferencias respecto a la cepa silvestre, desarrollando hifas más gruesas y cortas. En cuanto a las mutantes  $\Delta yap1$ , éstas mostraron un fenotipo muy similar al observado en la cepa silvestre. Finalmente las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  desarrollaron hifas aunque mucho más oblongas en contraste con las cepa silvestre (Figura 26).

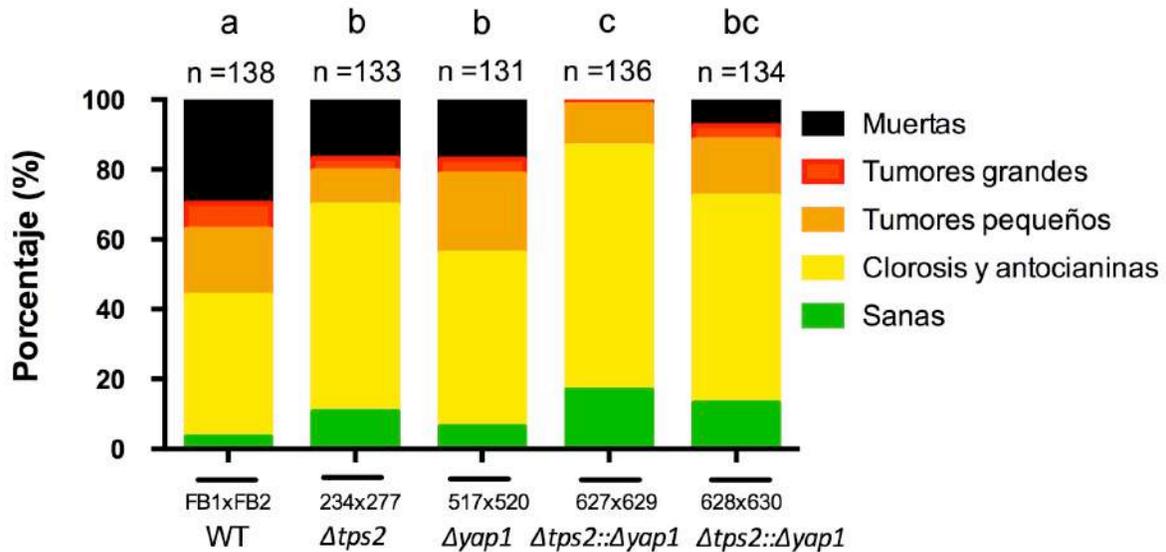


**Figura 26. Dimorfismo *in vitro* de *U. maydis*.** Las células se incubaron durante 24 horas en MM3 (panel superior) y MM7. (panel inferior). Las células fueron teñidas con calcoflúor white y fotografiadas con el microscopio compuesto triocular EPI-fluorescente Mod. M834FLR

AMSCOPE®. Las imágenes se capturaron en el programa ScopelImage 9.0. Los ensayos se realizaron por triplicado. FB2, cepa silvestre; 234, mutante  $\Delta tps2$ ; 520, mutante  $\Delta yap1$ , EH627, EH628, EH629 y EH630, dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Objetivo a 40X. Escala igual a 20  $\mu$ M.

### **La función de Yap1 y Tps2 es indispensable para la virulencia en *U. maydis***

Para el ensayo de patogenicidad en plantas de maíz (*Zea mays*, var. cacahuazintle), se inocularon plantas con cepas sexualmente compatibles, para ello se prepararon mezclas con las cepas silvestres (FB1xFB2), mutantes  $\Delta tps2$  (234x277), mutantes  $\Delta yap1$  (517x520) y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  (EH627xEH629 y EH628xEH630). Las plantas inoculadas con las cepas mutantes  $\Delta tps2$  presentaron clorosis, formación de antocianinas y pequeños tumores en los órganos aéreos de las plantas, es decir prácticamente no se desarrolló la enfermedad (Figura 27). En las plantas inoculadas con las mutantes  $\Delta yap1$  se observaron los mismos signos que las plantas que fueron inoculadas con las mutantes  $\Delta tps2$ . Se detectó presencia de clorosis, formación de antocianinas, tumores medianos y grandes en los órganos aéreos de las plantas y anomalías morfológicas durante el crecimiento de las mismas (Figura 27). Tal como se presenta en la cepa silvestre en la segunda fase del ciclo de vida de *U. maydis*, que es la fase infectiva del hongo en la planta (Figura 27) (Brefort et al. 2009; Ruiz-Herrera & León-Ramírez, 2012). En contraste, las plantas que fueron inoculadas con las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  mostraron una severa disminución de los signos, en comparación con las plantas que fueron inoculadas tanto por las cepas silvestres como por las mutantes de  $\Delta tps2$  y las de  $\Delta yap1$ , incluso cabe resaltar que son aún menos virulentas que las mutantes  $\Delta tps2$ , de acuerdo a lo que se conoce sobre la trehalosa, en la que en su ausencia las cepas son menos virulentas que las cepas parentales (Cervantes et al., 2016) (Figura 27). Cabe resaltar que la ausencia de *YAP1* también repercute en la disminución de la virulencia en las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , considerando la participación que tiene el factor de transcripción Yap1 como regulador principal en la respuesta a estrés.



**Figura 27. Análisis de los signos producidos por las diferentes cruces de las cepas de *U. maydis*.** El número de plantas infectadas es indicado en la parte superior de cada columna. De izquierda a derecha, se muestran las cruces de las cepas silvestres, las mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Se utilizó como análisis estadístico una prueba de Kruskal-Wallis.  $P < 0.0025$ .

### Participación de *Um01947* y *Um02153* en el proceso infeccioso de *U. maydis*

Uno de los procesos más intrigantes durante el proceso infeccioso llevado a cabo por *U. maydis* es la formación de tumores en la planta, que aparece localmente en los sitios de infección, tanto en los tejidos vegetativos como en los florales (Skibbe *et al.* 2010). Después de la penetración de la superficie de la planta dentro de las primeras 24 horas posteriores a la infección, *U. maydis* crece hacia las células de la vaina a los 2 días posteriores a la infección (dpi) e induce la formación de tumores a partir de los 4 dpi. Todas esas células tumorales reemplazan el “collar” de células de la vaina del haz que normalmente rodean el tejido vascular y el tejido infectado se agranda. Dentro de los tumores que resultan el hongo se ramifica activamente y prolifera a los 6 dpi. Durante la maduración de los tumores, que se finaliza después de los 12 dpi, se forman agregados de esporas (Matei *et al.* 2016). El ARN de la infección de *U. maydis* en el maíz, fue aislado de las plantas a las 16 horas, 2 días y 6 días posteriores a la infección

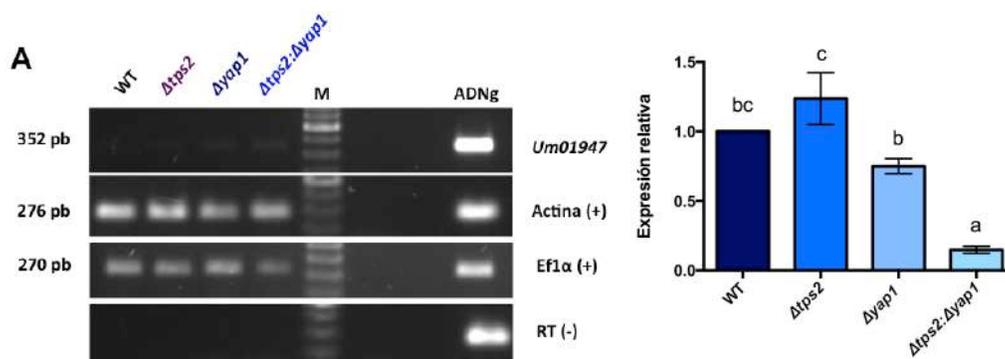
producida por las cepas parentales, mutantes *Δtps2*, *Δyap1* y dobles mutantes *Δtps2::Δyap1*. Para analizar el nivel de expresión en el proceso infeccioso de *U. maydis* en la planta del maíz, del gen de *Um01947* que codifica para la proteína Citocromo-c-peroxidasa y *Um02153* que codifica para la proteína Alquilhidroperóxido reductasa, ambas involucradas directamente en la detoxificación de las ROS, y que a su vez el factor de transcripción Yap1 es el encargado de activar su expresión ante presencia de dichos peróxidos en condiciones *in vitro* (Molina & Kahmann, 2007).

### **Citocromo-c-peroxidasa *Um01947***

Respecto a este gen, sabemos que es uno de los genes involucrados principalmente en la detoxificación de las ROS. Está regulado por Yap1, en la presencia de estrés oxidativo (Molina & Kahmann, 2007). De acuerdo con la base de datos de *Ustilago* (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>) éste gen se localiza en el cromosoma número tres. Codifica para una proteína de 330 amino ácidos, la localización subcelular de la proteína es mitocondrial. En *S. cerevisiae* está involucrada en el transporte de electrones, en la mitocondria y en la reacción de las peroxidasas (Erman & Vitello, 2002). En el caso de *U. maydis* está involucrada en la respuesta a estrés oxidativo y en la detoxificación de radicales. Como función principal, destruye los radicales que son producidos normalmente dentro de la célula y que son tóxicos para el sistema biológico. Así mismo, actúa como cofactor de unión al grupo hemo B. La estructura de la proteína es secundaria con hélices alfa ( $\alpha$ ) en su totalidad. Se fosforila en los restos de serina, treonina y tirosina (Martins *et al.*, 2013).

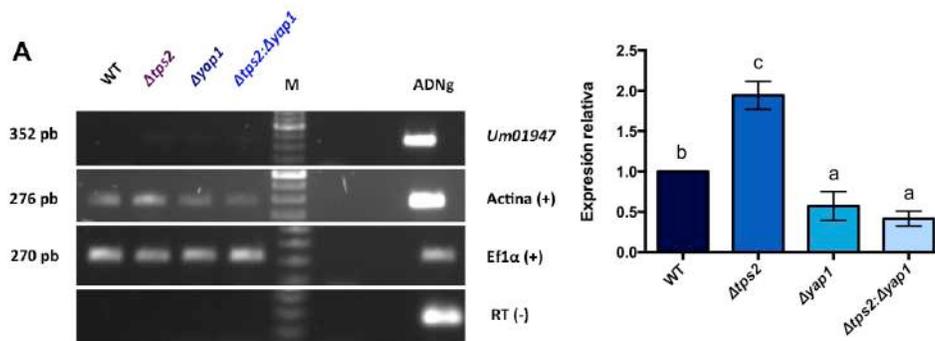
A las 16 horas posteriores a la infección observamos que en ausencia del gen *TPS2*, se muestra una sobre-expresión de *Um01947* en donde rebasa incluso los niveles señalados por las cepas silvestres. En ausencia de *YAP1* disminuyen los transcritos de *Um01947* y lo hace aún más en la doble mutación (Figura 28). Estos datos nos están indicando que la ausencia del gen *TPS2* es compensada con una sobre-expresión del gen detoxificador *Um01947*. Encontramos diferencias significativas entre las cepas silvestres y las dobles mutantes, así como entre las

mutantes  $\Delta tps2$  y las cepas  $\Delta yap1$ , entre  $\Delta tps2$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  y finalmente entre la mutante  $\Delta yap1$  con las dobles mutantes. Es claro que la ausencia de *YAP1* disminuye los transcritos de *Um01947*, ya que es un gen que se encuentra regulado por este factor de transcripción, lo interesante es que esta disminución se reduce aún más con la ausencia de ambos genes. Este dato nos indica que cabe la posibilidad de que *YAP1* y *TPS2* de alguna manera se compensan, ya que en la ausencia de ambos genes podemos apreciar cambios totalmente drásticos (Figura 28).



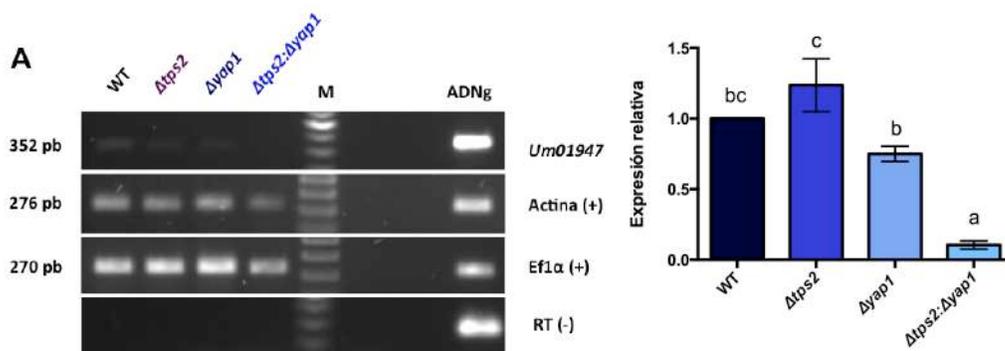
**Figura 28. Expresión de *Um01947* (Citocromo-c-peroxidasa) en plantas infectadas a las 16 hpi.** Se infectaron plantas con las cepas silvestres FB2/FB1 (WT), mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .  $P < 0.0001$ ,  $F = 68.29$ ,  $DF = 3$ .

A los 2 dpi volvemos a obtener el mismo fenómeno puesto que *Um01947* se sobre-expresa en ausencia de *TPS2*. A este tiempo, podemos ver que en ausencia de *YAP1* disminuyen aún más los transcritos de *Um01947* en comparación con lo observados a las 16 hpi (Figura 28). Quizás es en esta etapa del proceso de la infección en donde *Um01947* actúa como detoxificador. En este tiempo encontramos diferencias significativas entre las cepas parentales con las mutantes  $\Delta tps2$ , entre las silvestres con las mutantes  $\Delta yap1$ , entre las silvestres con las dobles mutantes, entre las mutantes  $\Delta tps2$  con las de  $\Delta yap1$ , y finalmente entre  $\Delta tps2$  y las dobles mutantes (Figura 29).



**Figura 29. Expresión de *Um01947* (Citocromo-c-peroxidasa) en plantas infectadas a los 2 dpi.** Se infectaron plantas con las cepas silvestres FB2/FB1 (WT), mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .  $P < 0.0001$ ,  $F = 79.91$ ,  $DF = 3$

A los 6 dpi seguimos viendo una sobre-expresión de *Um01947* a causa de la ausencia de *TPS2*, los transcritos también disminuyen con la ausencia de *YAP1*. Finalmente con las cepas dobles mutantes, la expresión es aún más baja, encontramos diferencias significativas entre las cepas silvestres con las dobles mutantes, las mutantes  $\Delta tps2$  con las de  $\Delta yap1$ , las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  con las mutantes  $\Delta yap1$  y  $\Delta tps2$  (Figura 30). El fenómeno observado en los 3 tiempos es prácticamente el mismo, en donde vemos que en ausencia de *TPS2*, *U. maydis* activa otros mecanismos de defensa que le permiten detoxificar las ROS generadas por la planta y así continuar con el proceso infeccioso. Podemos considerar que la participación del factor de transcripción Yap1 y este disacárido de la trehalosa en conjunto participan en gran medida en este proceso infeccioso por parte de *U. maydis*.



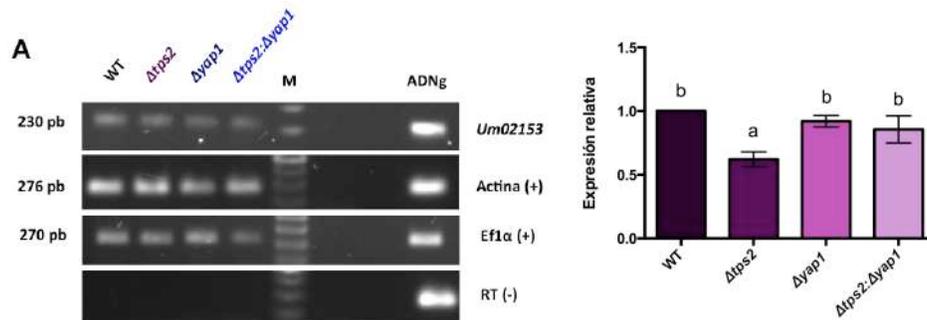
**Figura 30. Expresión de *Um01947* (Citocromo-c-peroxidasa) en plantas infectadas a los 6 dpi.** Se infectaron plantas con las cepas silvestres FB2/FB1 (WT), mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .  $P < 0.0001$ ,  $F = 73.88$ ,  $DF = 3$ .

### Alquil-hidroperóxido reductasa *Um02153*

La alquil-hidroperóxido reductasa es codificada por el gen *Um02153* y regulada por Yap1, se encarga de la detoxificación de las ROS en condiciones *in vitro* (Molina & Kahmann, 2007). De acuerdo con la base de datos <http://pedant.helmholtz-muenchen.de> éste gen se localiza en el cromosoma número 5. Así mismo, codifica para una proteína con una secuencia de 531 amino ácidos. Su localización subcelular es en el retículo endoplásmico (RE). Está involucrada con el metabolismo de poliaminas, de carbohidratos, con el catabolismo aerobio aromático, metabolismo de vitaminas, cofactores y grupos prostéticos, metabolismo secundario, transporte de electrones, detoxificación por modificación, quimiorrepción y respuesta a estrés. (Cha *et al.*, 2003; Lian *et al.* 2012; Morano *et al.*, 2012).

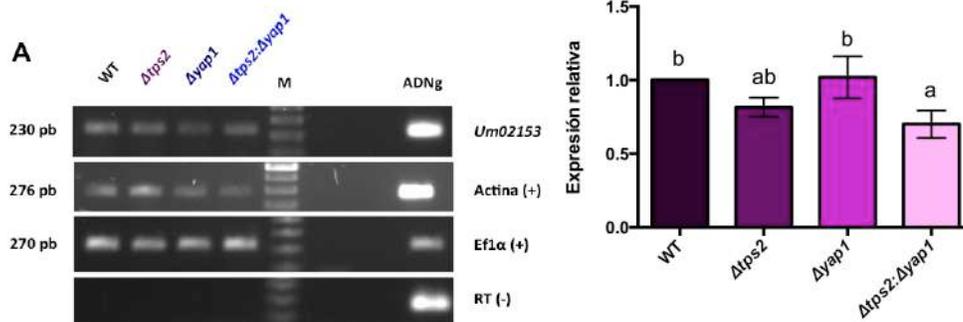
En nuestros ensayos de RT-PCR a las 16 hrs pi, observamos que la expresión de *Um02153* en las mutantes  $\Delta tps2$  disminuye respecto a las cepas silvestres pero no lo hace en las mutantes  $\Delta yap1$  ni en las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Nuestros resultados señalan diferencias significativas entre las cepas silvestres y las mutantes  $\Delta tps2$  y también entre las mutantes  $\Delta tps2$  y  $\Delta yap1$  con las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Estos resultados nos indica que a las 16 horas posteriores a la infección (hpi) la ausencia de trehalosa afecta la expresión

de *Um02153*, pero no así la ausencia de *YAP1* y tampoco se ve afectada por la doble mutación (Figura 31).



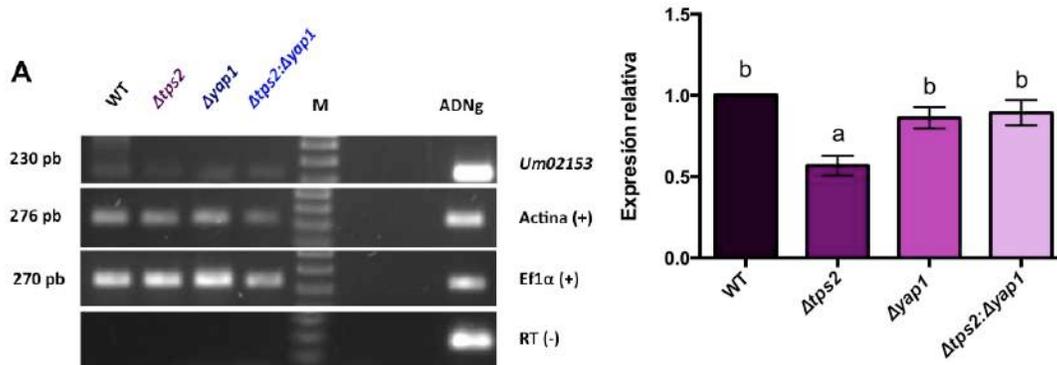
**Figura 31. Expresión de *Um02153* (Alquil-hidroperóxido reductasa) en plantas infectadas a las 16 hpi.** Se infectaron plantas con las cepas silvestres FB2/FB1 (WT), mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .  $P < 0.0005$ ,  $F = 19.01$ ,  $DF = 3$ .

A los 2 dpi volvemos a observar el mismo fenómeno visto anteriormente en donde la ausencia de *TPS2* provoca la disminución de los niveles de expresión de *Um02153*, pero no en la ausencia de *YAP1*. Sin embargo, aquí ya apreciamos una disminución en la expresión de *Um02153* con la doble mutación (Figura 32). Nuestros resultados nos arrojan diferencias significativas entre las cepas silvestres y la doble mutación, así como en la mutante  $\Delta yap1$  con la doble mutante (Figura 32).



**Figura 32. Expresión de *Um02153* (Alquil-hidroperóxido reductasa) en plantas infectadas a los 2 dpi.** Se infectaron plantas con las cepas silvestres FB2/FB1 (WT), mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .  $P < 0.0076$ ,  $F = 8.340$ ,  $DF = 3$ .

Finalmente, a los 6 dpi volvemos a observar exactamente el mismo fenómeno, en donde en ausencia de *TPS2* los transcritos de *Um02153* se ven afectados, pero no con la ausencia del gen *YAP1* ni con la doble mutación. En donde observamos diferencias significativas entre las cepas silvestres con las mutantes  $\Delta tps2$ , entre las mutantes  $\Delta tps2$  y las mutantes  $\Delta yap1$  y finalmente entre las mutantes  $\Delta tps2$  y la doble mutación (Figura 33). Todos estos resultados nos están indicando que la participación de *TPS2* es fundamental para la expresión de *Um02153* que es requerido para la detoxificación de las ROS. También cabe considerar la posibilidad de que en ausencia de *YAP1*, *Um02153* es regulado por otro factor de transcripción no especificado.



**Figura 33. Expresión de *Um02153* (Alquil-hidroperóxido reductasa) en plantas infectadas a los 6 dpi.** Se infectaron plantas con las cepas silvestres FB2/FB1 (WT), mutantes  $\Delta tps2$ ,  $\Delta yap1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ .  $P < 0.0001$ ,  $F = 29.42$ ,  $DF = 3$ .

## DISCUSIÓN

La ráfaga oxidativa es parte de la respuesta inmune innata de las plantas, la cual es finamente regulada para evitar daños a éstas (Segal *et al.*, 2018). El metabolismo de las ROS es central en el proceso de infección, así como su producción y neutralización para el éxito en el proceso de colonización del hospedero (Segal *et al.*, 2018). En este sentido, la habilidad de detoxificar las ROS tiene un papel central para la patogénesis (Haijie *et al.*, 2018). Dependiendo de la estrategia de infección que utilicen éstos para modular la respuesta inmune, y así manipular los procesos metabólicos, pueden causar desde la muerte celular rápida en el tejido colonizado o solamente suprimen la respuesta inmune de la célula hospedera (Schilling *et al.*, 2014). Este “patosistema” *Ustilago maydis* – *Zea mays* tiene una interacción biotrófica que persiste durante el desarrollo del hongo dentro de la planta hospedera (Lanver *et al.*, 2014). Puesto que establece una interacción compatible en la que mantiene viva y permite la reprogramación metabólica en su beneficio permitiendo así completar su ciclo de vida (Lanver *et al.*, 2017).

### **En *U. maydis* Yap1 es una proteína única**

En relación a las proteínas Yap1 presentes en otros hongos, se ha determinado que en *S. cerevisiae* existen al menos ocho proteínas Yap (Yap1-Yap8). La participación de la familia Yap en su mayoría es en respuesta a diferentes tipos de estrés. En *S. cerevisiae*, Yap1 es el regulador principal del estrés oxidativo, Yap2 en respuesta a estrés por la presencia de cadmio, Yap4 y Yap6 al estrés osmótico, Yap1 y Yap5 están involucrados en el metabolismo de algunos metales como el hierro, Yap1 y Yap8 para la detoxificación de componentes de arsénico, mientras que las funciones de Yap3 y Yap7 aún no están bien definidas (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010).

Por otra parte, en *C. glabrata* y *C. albicans*, también se ha reportado que Yap forma una familia (Merhej *et al.*, 2016). En contraste, nuestros resultados *in silico* indican que *U. maydis* cuenta con una sola proteína Yap1, que quizás podría cubrir las funciones que son realizadas por las demás proteínas de la familia Yap

en *S. cerevisiae* o en las especies de *Candida*. Incluso se habla de un posible ancestro en común de los factores de transcripción relacionados con Yap1, en donde los sitios de unión de Yap1 dependen de las secuencias específicas en los promotores de los genes regulados, éstas pueden llegar a variar por una mutación puntual (Kuo *et al.*, 2010).

Es posible que en este sentido las proteínas de la familia Yap de *S. cerevisiae* divergen de la proteína Yap1 de *U. maydis* por alguna cuestión evolutiva que desconocemos, así como el nicho ecológico, además aunado a los procesos de duplicación que son comunes en la levadura (Escalera-Fanjul *et al.*, 2018). Cabe mencionar que ambos organismos divergen por clados en el sentido de que se trata de un organismo ascomiceto y otro basidiomiceto respectivamente (Kuo *et al.*, 2010). Tal como la divergencia evolutiva que existe entre *C. albicans* y *C. glabrata*, puesto que la función de Yap3 se ha dividido en dos proteínas quizás por las condiciones de crecimiento de cada levadura (Merhej *et al.*, 2016).

### **Modelo por homología de la proteína Yap1**

En condiciones normales Yap1 se distribuye entre el citoplasma y el núcleo, pero sobre todo se localiza en el citoplasma debido a su exportación activa desde el núcleo. El estrés oxidativo inicia su proceso de activación, en el que uno de los residuos de cisteína junto con Gpx3 (peroxidasa dependiente de glutatión) se oxida a sulfóxido e interactúa con un residuo de cisteína de Yap1, haciendo que cambie su conformación mediante la formación de dos enlaces disulfuro intramoleculares cubriendo la secuencia de exportación nuclear (Delaunay *et al.*, 2000; Molina & Kahmann, 2007). Esto provoca que se acumule en el núcleo y active la expresión de genes específicamente involucrados en la respuesta a estrés (Molina & Kahmann, 2007; Morano, 2012).

De acuerdo al modelo de homología de la estructura tridimensional de la proteína Yap1 de *U. maydis* que obtuvimos, destaca la presencia de los residuos de cisteína 42, 172 y 233 que son importantes para su activación y concuerdan con lo descrito previamente (Zhang, 2009; Ambrish *et al.*, 2012; Yang & Zhang, 2015). Como mencionamos, Yap1 puede ser activado por dos mecanismos

principalmente, uno de ellos es a través de las ROS, mientras que el otro es por productos químicos que reaccionan con el grupo tiol como electrófilos y cationes de metales pesados divalentes (Azevedo *et al.*, 2003; Morano, 2012; Pimentel *et al.*, 2014). Una vez que la célula se encuentra en estrés oxidativo Yap1 inicia su proceso de activación, en el que uno de los residuos de cisteína junto con la peroxidasa Gpx3 se oxida y cambia su conformación mediante la formación de dos enlaces disulfuro intramoleculares cubriendo la secuencia de exportación nuclear (Delaunay *et al.*, 2000; Molina & Kahmann, 2007). Esto provoca que Yap1 se acumule en el núcleo y active la expresión de genes blanco, esto fue determinado por su localización vía la proteína verde fluorescente (Molina & Kahmann, 2007; Morano, 2012). Esta característica estructural nos permite comparar la función de Yap1 de *U. maydis* en la respuesta a estrés con la de otros modelos de estudio, puesto que se conservan entre sí como es el caso de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. pombe*, *C. neoformans* y *M. oryzae* (Briones *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2015; Merhej *et al.*, 2016).

### **Regulación transcripcional de la síntesis de trehalosa por medio de Yap1**

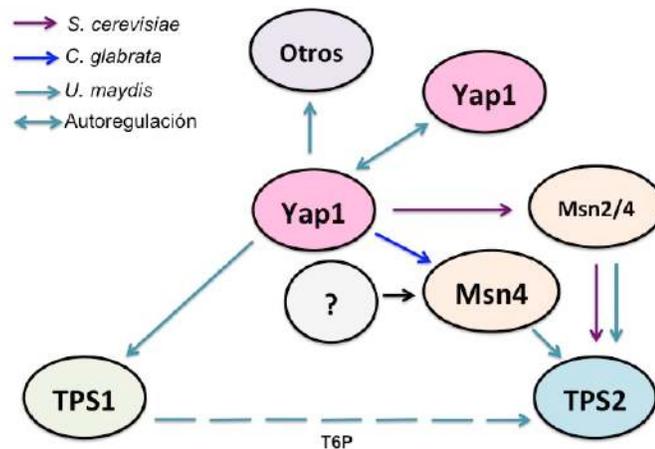
Yap1 es el principal regulador en la respuesta a estrés oxidativo en organismos como *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Diezmann, 2014). Regula la respuesta antioxidante por mecanismos tanto enzimáticos como no-enzimáticos que detoxifican, reducen de la tasa de producción de ROS y reparan los daños generados en las macromoléculas (Ribeiro *et al.*, 2015). La trehalosa es considerada una molécula protectora ante situaciones de estrés. De manera interesante se ha reportado que los promotores de los genes *TPS1* y *TPS2* involucrados en la síntesis de trehalosa, poseen el sitio de reconocimiento de Yap1 en levadura (Voit, 2003). Es por ello que la expresión de *TPS2* está regulada por Yap1 y parcialmente en *TPS1* (Gounalaki & Thireos, 1994; Bleoanca *et al.* 2013). Sin embargo en *U. maydis* Molina & Kahmann (2007), reportaron la secuencia 5'-TT/GAC/GT/CA/A-3' como el sitio de unión en los promotores de los genes regulados por Yap1. Nuestros análisis *in silico*, no identificaron dicho sitio en el promotor de *TPS2* en *U. maydis*, *U. hordei* y *C. neoformans*, pero sí en el

promotor de *TPS1* de *U. maydis*, el cual es un intermediario en la síntesis de trehalosa. No obstante, nuestros resultados sugieren una posible relación entre la trehalosa y el factor de transcripción Yap1 en *U. maydis*. Puesto que, las mutantes  $\Delta tps2$  son altamente sensibles a las ROS y Yap1 es el principal regulador en la ráfaga oxidativa. Así mismo, encontramos que las mutantes  $\Delta yap1$  producen menor cantidad de trehalosa.

### **Las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta yap1$ son altamente sensibles al estrés oxidativo**

La producción de peróxidos es la principal línea de defensa de la planta en contra de los patógenos (Lehmann *et al.*, 2015). La adaptación al estrés oxidativo es necesaria para la supervivencia de *U. maydis* durante el proceso de infección (Molina & Kahmann, 2007; Lehmann *et al.*, 2015). En este estudio, encontramos que *UmYap1* es muy importante en la tolerancia al estrés oxidativo *in vitro*. Así como la importancia de la trehalosa, ya que de manera individual la ausencia del gen en cuestión, produce mutantes sensibles ante tal insulto. A este respecto, las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  mostraron ser aún más sensibles ante este tipo de estrés, sugiriendo un efecto aditivo de la ausencia de estos genes. En *U. maydis*, otras vías de respuesta a estrés general y oxidativo pueden compensar la ausencia de Yap1 en respuesta al peróxido (como las catalasas, superóxido dismutasas, glutatión, tioredoxinas, factores de transcripción como Hsf1, Skn7, Msn2 y Msn4). La activación de estos factores regula la expresión y la síntesis de proteínas asociadas a la respuesta por choque térmico, como la producción de trehalosa y proteínas antioxidantes, las cuales están involucradas en la protección celular durante el estrés (Gasch *et al.*, 2001; Nikolaou *et al.*, 2009; Montibus *et al.*, 2013; Briones *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2015). Mientras que los factores de transcripción Msn2 y Msn4 regulan a *TPS2* en *S. cerevisiae* como respuesta general al estrés y en el control del daño oxidativo (Diezmann, 2014). Lo cual también nos indica que podemos considerar que la participación de *YAP1* junto con *TPS2* es fundamental para responder a este tipo de estrés, puesto que en *C. glabrata* Yap1 activa la expresión de Msn4, estableciendo una red de activación.

Así mismo, Yap1 regula a SNK7 el cuál actúa en respuesta a estrés oxidativo activando a superóxido dismutasas (Merhej *et al.*, 2016; Auesukaree, 2017). En el caso de las mutantes deficientes de trehalosa en *S. cerevisiae* son mucho más susceptibles a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y acumulan más proteínas oxidadas que las cepas silvestres (Benaroudj *et al.*, 2001). La trehalosa protege la membrana de lesiones generadas por el estrés oxidativo, como las que produce la menadiona (Herdeiro *et al.*, 2006; Bleonca *et al.*, 2013). Se ha reportado que las cepas de *U. maydis*, con delección en el sistema de detoxificación Yap1-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no toleran la exposición al peróxido y la virulencia en las plantas de maíz se reduce (Molina & Kahmann, 2007), tal como lo vimos en nuestros resultados. Esto sugiere que *UmYAP1* y *UmTPS2* en conjunto cumplen una función determinadamente en la tolerancia celular a los oxidantes en *U. maydis*, para lo cual proponemos el siguiente esquema (Figura 34).



**Figura 34. Esquema hipotético de la relación del factor de transcripción Yap1 con la trehalosa.** Se propone que en *U. maydis*, el factor de transcripción Yap1 regula genes que están involucrados también en la síntesis de trehalosa. Tal como se ha propuesto que ocurre en los organismos modelos de estudio *S. cerevisiae* y *C. glabrata* con los genes *MSN2*, *MSN4*, *TPS1* y *TPS2* respectivamente. Las proteínas que son reguladas por Yap1 en *S. cerevisiae* están indicadas en flechas de color morado, las que son reguladas en *C. glabrata* en azul y las que son reguladas por *U. maydis* en color verde.

## **Las mutantes $\Delta yap1$ acumulan menor cantidad de trehalosa en estrés osmótico y oxidativo**

Para *U. maydis*, la vía principal que actúa como detoxificador de peróxido, es mediada por Yap1 (Molina & Kahmann, 2007). En nuestros resultados observamos disminuida la cantidad de trehalosa producida en la mutante  $\Delta yap1$ , en contraste con la cepa silvestre FB2 cuando fueron expuestas a estrés oxidativo y osmótico, ésta disminución puede estar relacionada con una activación transcripcional vía Yap1 sobre los genes involucrados en la síntesis de trehalosa considerando que *TPS1* posee un sitio de unión a Yap1. Por otro lado, puesto que también se ha propuesto que Yap1, puede estar involucrado en la activación transcripcional de los genes involucrados en la síntesis de trehalosa (*TPS2*, *TSL1* y *TSS1*) en *S. cerevisiae* (Gounalaki & Thireos, 1994), ya que la trehalosa protege en condiciones de estrés oxidativo y osmótico (Cervantes *et al.*, 2016; Herdeiro *et al.*, 2006; Benaroudj *et al.*, 2001). Cabe destacar que en *S. cerevisiae* se observó un escenario similar, en el que la mutante  $\Delta yap1$  acumula niveles de trehalosa más bajos en comparación con las cepas silvestres (Bleonca *et al.*, 2013). Por otra parte, también se sabe que los niveles de transcrito de *TPS2* en *C. albicans* disminuyeron en las mutantes  $\Delta yap1$  en comparación con las cepas silvestres y por lo tanto la trehalosa contenida fue mucho menor cuando las cepas fueron expuestas a  $H_2O_2$  (Cao *et al.*, 2008).

Por otra parte, también analizamos la expresión del gen *YAP1*, puesto que éste es un gen maestro encargado de la activación de genes detoxificadores (Auesukaree, 2017) y encontramos que hay una sobre-expresión de éste en las mutantes  $\Delta tps2$  cuando las células fueron expuestas a estrés osmótico y oxidativo (Figura 24). Esta sobre-expresión puede ser debido a una respuesta de la célula para compensar la falta de trehalosa y sobrevivir. Estos datos nos permiten sugerir que la sensibilidad observada en la mutante  $\Delta yap1$  ante estos tipos de estrés, está relacionada con la disminución de síntesis de trehalosa. Puesto que en hongos como *C. albicans*, *M. oryzae*, *Stagnospora nodorum* incluyendo a *U. maydis* la ausencia o disminución de trehalosa conlleva a la alta sensibilidad sobre todo en situaciones de estrés oxidativo (Lowe *et al.*, 2009; Iordarchescu & Imai, 2011).

En *S. cerevisiae* utilizaron el gen reportero *lacZ* para identificar en el promotor de *TPS2* los elementos de respuesta a estrés (STRE) identificados como CCCCT o C<sub>4</sub>T. Además, con la inducción de estrés, midieron la acumulación de mRNA de *TPS2*, así como la actividad de la β-galactosidasa con el mismo gen reportero *TPS2-lacZ*, entonces demostraron que *YAP1* es epistático a la vía RAS-PKA y confirmaron la participación de *YAP1* en la regulación transcripcional del *TPS2* (Gounalaki & Thireos, 1994).

### **La tolerancia al estrés osmótico y salino se atribuye a *TPS2***

La exposición al NaCl y KCl impone estrés osmótico y catiónico, lo que provoca una rápida pérdida de agua, se reduce el tamaño celular y disminuye la presión de la turgencia (Brown *et al.*, 2014). El crecimiento de las mutantes  $\Delta tps2$  se ve severamente afectado, en comparación con la mutante  $\Delta yap1$ . Este dato está relacionado con lo observado en *S. cerevisiae*, en el que a la trehalosa se le atribuye un papel fundamental para la supervivencia durante el estrés osmótico (Auesukaree, 2017). Considerando que las mutantes  $\Delta yap1$  en *S. cerevisiae* producen menor cantidad de trehalosa en estrés osmótico, esto sugiere que se potencia el efecto de la ausencia de trehalosa en las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  puesto que carecen por completo de trehalosa. Es posible que el crecimiento que observamos en las mutantes  $\Delta yap1$  se deba a otro mecanismo de respuesta como la vía Hog1 que también responde al estrés osmótico (Herrero de Dios *et al.*, 2010; de Assis *et al.*, 2018).

En *C. albicans* durante el estrés osmótico se activa la fosforilación y la acumulación nuclear de SAPK Hog1, que a su vez activa genes diana que codifican enzimas que participan en la biosíntesis del glicerol y confiere protección a la célula (Enjalbert *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2014). En *A. fumigatus* existe una relación entre las rutas CWI, PKA y HOG, las cuales son importantes para la movilización de azúcares almacenados, tal como la trehalosa y el glucógeno, con la consiguiente remodelación de la pared celular durante el estrés osmótico y el daño a la misma (de Assis *et al.*, 2018). De manera paralela, es posible que en nuestros resultados la disminución de trehalosa en las mutantes  $\Delta yap1$ , se deba a

su movilización previamente almacenada para la remodelación de la pared celular en situaciones de estrés osmótico. Por otro lado, en *S. cerevisiae* los factores de transcripción Mns2 y Mns4 actúan en conjunto con la vía de PKA o vía Hog1 (Herrero de Dios *et al.*, 2010; de Assis *et al.*, 2018). Cabe mencionar que por nuestros resultados *in silico*, detectamos la presencia de los sitios de unión a Msn2 y Msn4 en el promotor de *TPS2* de *U. maydis* que coinciden con la secuencia consenso CCCCT o C<sub>4</sub>T previamente propuesta por Gounalaki & Thireos (1994).

El estrés salino induce toxicidad iónica, altera el potencial de membrana, que a su vez afecta a los transportadores de membrana, la estabilidad de los iones y el pH en la célula, lo que conlleva a la generación de las ROS y el plegamiento incorrecto de las proteínas (Hande *et al.*, 2018). En levadura, el mayor determinante para la tolerancia al estrés salino es la ATPasa Ena1 (Bubnová *et al.*, 2014), ésta bombea de la célula el sodio y los cationes de litio tóxicos, probablemente a través del sistema Hal3/Ppz. En *S. cerevisiae* la resistencia al litio está ligada a Ptc1, Hal3, Trk1/2 que son algunos de los principales transportadores involucrados en la captación de potasio (Zaidi *et al.*, 2012). En *S. cerevisiae*, el LiCl afecta el crecimiento y responde acumulando trehalosa (Barozai *et al.*, 2014; Hande *et al.*, 2017).

Es posible que en *U. maydis* ocurra un efecto similar en el que la acumulación de trehalosa evita que los transportadores de membrana expulsen el litio tóxico, puesto que observamos crecimiento en las cepas carentes de trehalosa, por lo cual experimentos que involucren el análisis transcripcional del sistema Ena en *U. maydis*, contribuirán a comprender el proceso. En *U. maydis* hay dos tipos de ENA ATPasas, UmEna1 y UmEna2, ambas son indispensables para el crecimiento y están asociadas con la protección durante el exceso de los cationes de sodio y potasio en ambientes alcalinos (Begoña *et al.*, 2009).

## ***UmYAP1* y *UmTPS2* no son esenciales para tolerar la presencia de metales pesados**

En cantidades excesivas el cobalto es potencialmente mortal para las células (Valko *et al.*, 2005) y el cadmio es altamente tóxico y de manera indirecta es una fuente de estrés oxidativo y carcinógeno para el humano (Morano *et al.*, 2012; Mazzola *et al.*, 2015). En *S. cerevisiae* el principal detoxificador de cadmio es Ycf1, un transportador de membrana vacuolar y Yap1 activa la expresión de *YCF1* (Mazzola *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestros resultados no observamos mucha diferencia entre el crecimiento de las cepas silvestres con respecto a las mutantes  $\Delta yap1$ ,  $\Delta tps2$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ . Por lo que consideramos que *UmYAP1* y *UmTPS2* no son esenciales para tolerar la presencia de metales pesados como el cadmio y el cobalto.

## **La ausencia de trehalosa y de Yap1 afecta la virulencia en *U. maydis*.**

La participación de Yap1 en el proceso de patogenicidad es diferencial en relación al hongo del que se trate (Guo *et al.*, 2011). Los hongos patógenos de plantas se caracterizan por sus estrategias de infectar a su hospedero, así como por su estilo de vida ya sea: necrótrofos, hemibiotrofos y biotrofos (Segal *et al.*, 2018). En hongos necrótrofos como *B. cinerea*, *Cochliobolus heterostrophus*, *F. graminearum*, el homólogo de Yap1 (Bap1, Chap1, Fgap1, respectivamente) aunque es necesario para resistir el estrés oxidativo no es indispensable para la proliferación en la planta ni para la virulencia (Lev *et al.*, 2005; Temme & Tudzynski, 2009; Montibus *et al.*, 2013). Caso contrario en *Alternaria alternata*, en donde el gen homólogo *AaAP1* sí es indispensable para la virulencia (Lin *et al.*, 2009). Mientras que, por otro lado en los hemibiotrofos como *M. oryzae* y *Colletotricum gloeosporidoides*, Yap1 participa en la detoxificación de las ROS, la secreción de peroxidasa y lacasa, así como tienen un papel claro en la virulencia (Montibus *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016; Segal & Wilson, 2018). Los homólogos a Yap1 son requeridos para una completa y eficaz respuesta a estrés oxidativo, pero su participación en la virulencia es divergente y sugiere que otros factores son redundantes en respuesta a la ráfaga oxidativa (Montibus *et al.*, 2013).

Un paso clave es la formación de un filamento dicariótico tras el reconocimiento de dos esporas haploides en la superficie de la hoja, que es el requisito previo para el desarrollo de la hifa dicariótica, la cuál es la única forma del hongo capaz de producir la enfermedad (Matei *et al.*, 2016). El efecto en el crecimiento a pH 3 de las mutantes *Δtps2* se vió reflejado en la formación de hifas más gruesas y cortas, lo que podría limitar la proliferación de estas en la planta y disminuya los síntomas y por lo tanto disminuye la virulencia, mientras que en las mutantes *Δyap1* el fenotipo fue muy similar al de las cepas silvestres y en las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1* las hifas son más oblongas (Figura 26). En las pruebas de apareamiento, las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1*, no se vieron afectadas ya que formaron las típicas hifas (Figura 6. Panel C). Por este motivo, la reducción de la virulencia observada en las plantas de maíz no se encuentra relacionada con éste fenómeno (Brefort *et al.*, 2009). En este trabajo mostramos que la ausencia de los genes *TPS2* y *YAP1*, no eliminan por completo los signos presentes en las plantas infectadas con las dobles mutantes *Δtps2::Δyap1*. Sin embargo, estadísticamente sí son menos virulentas que las mutantes simples. Sugiriendo la participación de ambos de manera sinérgica para que el hongo pueda proliferar y producir los síntomas de enfermedad en la planta.

Por otra parte, *U. maydis* al establecer una interacción biótrfica con el hospedero, mantiene una interacción favorable en su beneficio (Lanver *et al.*, 2017). No obstante, durante el proceso infectivo las ROS generadas por las plantas actúan como principales tóxicos en el sitio de la infección (Hemetsberger *et al.*, 2012). Es aquí, donde la proteína detoxificadora denominada como Yap1, regula además los genes *Um01947* y *Um02153* que codifican para citocromo-c- peroxidasa y el alquil-hidroperóxido reductasa respectivamente (Molina & Kahmann, 2007). En nuestros resultados, obtuvimos que ambos genes son expresados durante el proceso infectivo a las 16 horas, 2 y 6 días posteriores a la infección. En ausencia de *TPS2*, *Um01947* se sobreexpresa y rebasa los niveles que obtuvimos con respecto a las cepas silvestres durante el proceso infectivo, la ausencia de *YAP1* disminuyó la expresión de este gen mientras que la ausencia

de ambos genes repercute severamente en la expresión de *Um01947* que codifica para la citocromo-c-peroxidasa.

Por el contrario, con el gen *Um02153* que codifica para el alquil-hidroperóxido reductasa, la respuesta que obtuvimos fue contraria, en el cual la ausencia de *TPS2* disminuyó la expresión de éste, pero no tanto en la ausencia de *YAP1* ni en con la doble mutación. Durante el proceso infectivo, existen otro tipo de proteínas como las efectoras que desempeñan otras funciones que intervienen en el proceso infectivo y en la virulencia, tal como Pep1 que puede actuar como un inhibidor de las peroxidasas producidas por el hospedero, así como es capaz de inhibir la ráfaga oxidativa (Hemetsberger *et al.*, 2012). Este mecanismo de respuesta también permite compensar la ausencia de los genes *TPS2* y *YAP1* que son de importancia durante este proceso.

## CONCLUSIONES

- La síntesis de trehalosa es regulada por el factor de transcripción Yap1. A través del sitio putativo de reconocimiento para Yap1 en el promotor de *UmTPS1*. Y de manera indirecta por otros posibles factores de transcripción.
- La expresión del gen *UmTPS2* es reprimida en las mutantes  $\Delta yap1$  en respuesta al estrés por peróxido de hidrógeno.
- *UmYAP1* se sobre-expresa en las mutantes  $\Delta tps2$  en respuesta al estrés osmótico y oxidativo, como un mecanismo para mantener la viabilidad celular.
- Las cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$  muestran mayor sensibilidad a estrés oxidativo, osmótico y daño a la pared celular.
- Las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta yap1$ , están altamente afectadas en la virulencia. Señalando la importancia independiente de cada uno de los genes para llevar a cabo el proceso infeccioso, destacando la función protectora de la trehalosa.
- La ausencia de *TPS2* puede ser compensada por el factor de transcripción Yap1 y viceversa. Existe una inter-relación entre el factor de transcripción Yap1 y la síntesis de trehalosa.

## PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusión presentados en este trabajo, las perspectivas se orientan en las siguientes direcciones:

- Determinar a nivel experimental la existencia de otras proteínas que integran la familia Yap.
- Analizar por mutagénesis puntual la función de las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro.
- Estudiar el sistema Enal ATPasa en relación a la detoxificación del litio.
- Analizar la expresión de los genes *Um01947* y *Um02153* en condiciones de estrés *in vitro*.
- Obtener cepas mutantes del gen *Um01947* que codifica para la citocromo-c-peroxidasa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Bader N., Vanier G., Liu H., Gravelat F.N., Urb M., Hoareau C.M.-Q., Campoli P., Chabot J., Filler S.G. & Sheppard D.C. (2010). Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. 78 (7): 3007 – 3018.
- Ambrish R., Yang J., Zhang Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. Nucleic Acid Research, 40: w471 – w477.
- Auesukaree C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 20 (20): 1 – 10.
- Azevedo D., Tacnet F., Delaunay A., Rodrigues-Pousada C. & Toledano M.B. (2003). Two redox centers within *YAP1* for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiol-reactive chemicals signaling. Free Radical Biology & Medicine. 35 (8): 889 – 900.
- Bakalovic N., Passardi F., Ioannidis V., Cosio C., Penel C., Falquet L. & Dunand C. (2006). Peroxibase: A class III plant peroxidase database. Phytochemistry. 67: 534 – 539.
- Banuet F. & Herskowitz I. (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Genetics. 86: 5878 – 5882.
- Barozai M., Bashir F., Muzaffar S., Afzal S., Behlil F. & Khan M. (2014). In-silico identification and characterization of organic and inorganic chemical stress responding genes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Gene. 550: 74 – 80.
- Begoña B., Garciadeblás B., Pérez-Martín J., Rodríguez-Navarro A. (2009). Growth at high pH and sodium and potassium tolerance in media above the cytoplasmic pH depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. Eukaryotic cell. 8 (6): 821 – 829.

- Benaroudj N., Lee D.H. & Goldberg A.L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal Biol. Chem.* 276: 24261 – 24267.
- Berman J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. Review. *Current Opinion in Microbiology* 9: 595 – 601.
- Bleoanca I., Courelas A.R., Pimentel C., Rodrigues-Pousada C. & Andrade M. (2013). Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 116 (6): 697 – 705.
- Bölker M., Urban M. & Kahmann R. (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell.* 68: 441 – 450.
- 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.
- Brefort T., Tanaka S., Neidig N., Doehlemann G., Vincon V., Kahmann R. (2014). Characterization of the Largest Effector Gene Cluster of *Ustilago maydis*. *PLOS Pathogens.* 10(7): e1003866.
- Briones-Martin-del-Campo, M. Orta-Zavalza, E. Juárez-Cepeda, J. Gutiérrez-Escobedo, G. Cañas-Villamar, I. Castaño, I. & De Las Peñas, A. (2013). The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Rev. Iberoam. Micol.* 31(1): 67-71.
- Brown A.J.P., Budge S., Kaloriti D., Tillmann A., Jacobsen M.D., Yin Z., Ene I.V., Bohovych I., Sandai D., Kastora S., Potrykus J., Ballou E.R., Childers D.S., Shahana S. & Leach M.D. (2014). Stress adaptation in a pathogenic fungus. *The journal of Experimental Biology.* 217: 144 – 155.
- Botts M.R., Huang M., Borchardt R.K., Hull C.M. (2014). Developmental cell fate and virulence are linked to trehalose homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell.* 13 (9): 1158 – 1168.
- Boudreau B.A., Larson T.M., Brown D.W., Busman M., Roberts E.S., Kendra D.F. & McQuade K.L. (2013). Impact of temperature stress and validamycin A on

- compatible solutes and fumonisin production in *F. verticillioides*: Role of trehalose-phosphate synthase. *Fungal Genetics and Biology*. 57: 1 – 10.
- Bubnová M., Zemanciková J., Sychrová H. (2014). Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast*. 31: 309 – 321.
- Camejo D., Guzmán-Cedeño A. & Moreno A. (2016). Reactive oxygen species: essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 103: 10-23-
- Cao Y.Y., Wang Y., Dai B.D., Wang B., Zhang H., Zhu Z.Y., Xu Y.G., Cao Y.B., Jiang Y.Y. & Zhang G.Q. (2008). Trehalose is an important mediator of Cap1p oxidative stress response in *Candida albicans*. *Biol. Pharm. Bull.* 31 (3): 421 – 425.
- Caetano S.M., Menezes R., Amaral C., Rodrigues-Pousada C. & Pimentel C. (2015). Repression of the low affinity iron transporter gene *FET4* a novel mechanism against cadmium toxicity orchestrated by *YAP1* via *ROX1*. *Journal of Biological Chemistry*. 290 (30): 18584 – 18595.
- Cervantes-Chávez J.A., Valdés-Santiago L., Bakkeren G., Hurtado-Santiago E., León-Ramírez C.G., Esquivel-Naranjo E.U., Landeros-Jaime F., Rodríguez-Aza Y. & Ruíz-Herrera J. (2016). Trehalose is required for stress resistance and virulence of the Basidiomycota plant pathogen *Ustilago maydis*. *Microbiology* 162(6): 1009-1022.
- Chi M.H., Park S.Y., Kim S. & Lee Y.H. (2009). A novel pathogenicity gene is required in the blast fungus to suppress the basal defenses on the host. *PLOS pathogens*. 5 (4): e1000401.
- Chen L.H., Tsai H.C., Lu P.L. & Chung K.R. (2017). A major facilitator superfamily-transporter mediated resistance to oxidative stress and fungicides requires Yap1, Skn7 and MAP kinases in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *PLOS One*. 1-16.
- Choi J., Détry N., Ki-Tae K., Asiegbu F.O., Valkonen J.P.T & Lee Y. (2014). fPoxDB: fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC Microbiology*. 14: 117.

- Crowe, J.H. (2007). Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy. *Adv Med Biol* 594: 143-158.
- D’Autréaux B. & Toledano M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Molecular Cell Biology*. 8: 813 – 824.
- da Costa Morato Nery D., da Silva C.G., Mariani D., Fernandes P.N., Pereira M.D., Panek A.D., Eleutherio E.C. (2008). The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochem. Biophys Acta*. 1780: 1408 – 1411.
- de Assis L.J., Manfiolli A., Mattos E., Marilhano J., Malavazi I., Jacobsen I., Brock M., Cramer R., Thammahong A., Hagiwara D., Annick L. & Goldman G. (2018). Protein kinase A and high-osmolarity glycerol response pathways cooperatively control cell wall carbohydrate mobilization in *Aspergillus fumigatus*. 9 (6): e01952-18.
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z., Hammond-Kosack K.E., Di Prieto A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. & Foster G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13 (4): 414 – 430.
- Delaunay A., Isnard A.D., Toledano m.B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal*. 19 (19): 5157 – 5166.
- Diezmann S. (2014). Oxidative stress response and adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Fungal Biology Reviews*. 28: 126 – 136.
- Djamei A. & Kahmann R. (2012). *Ustilago maydis*: Dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLOS Pathogens*. 8 (11): e1002955.
- Doehlemann G., Berndt P. & Hahn M. (2006). Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology*. 152: 2625 – 2634.
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak & Carroll D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. 13 (4): 17-27.

- Eleutherio E., Panek A., De Mesquita J.F., Trevisol E., Magalhaes R. (2014). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr. Genet.* 61: 263 – 274.
- Elsztein C. (2011). The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: Involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for *YAP1*. *BMC Molecular Biology.* 12:30
- Enjalbert B., MacCallum D.M., Odds F.C. & Brown A.J. (2007). Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 75(1): 2143-2151.
- Escalera-Fanjul X., Quezada H., Riego-Ruiz L. & González A. (2018). Whole-genome duplication and yeast's fruitful way of life. *Cell Press Reviews.* 1 – 13.
- Farfsing J.W., Auffarth K. & Basse C.W. (2005). Identification of cis-active elements in *Ustilago maydis* *mig2* promoters conferring high-level activity during pathogenic growth in maize. *The American Phytopathological Society.* 18: 75-87.
- Fernandes L., Rodrigues-Pousada C. & Struhl K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Molecular and Cellular Biology.* 17 (12): 6982 – 6993.
- Foster A.J., Jenkinson J.M. & Talbot N.J. (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plants infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO Journal* 22: 225 – 235.
- Gancedo C. & Flores C.L. (2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 4: 351-359.
- Garcera A., Martínez A.I., Castillo L., Elorza M.V., Sentandreu R. & Valentín E. (2003). Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology.* 149: 2137 – 2145.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D. & Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the

- response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 4241 – 4257.
- Gill S.S. & Tuteja N. (2012). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 909-930.
- Gounalaki N. & Thireos G. (1994). Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *The EMBO Journal*. 13 (17): 4036 – 4041.
- Guo M., Chen Y., Du Y., Dong Y., Guo W., Zhai S., Zhang H., Dong S., Zhang Z., Wang Y., Wang P., Zheng X. (2011). The bZIP transcription factor *MoAP1* mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog*. 7(2): e1001302.
- Haijie M., Wang M., Gai Y., Fu H., Zhang B., Ruan R., Chung K.R. & Li H. (2018). Thioredoxin and glutaredoxin systems required for oxidative stress resistance, fungicide sensitivity, and virulence of *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 84 (14): e00086-18.
- Hande S., Alkim C. & Sezgin T. (2018). Physiological and transcriptomic analysis of a salt-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant obtained by evolutionary engineering. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 18 (1): 55 – 65.
- Hemetsberger C., Herrberger C., Zechmann B., Hillmer M. & Doehlemann G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *Plos Pathogens*. 8 (5): e1002684.
- Hemetsberger C., Mueller N.A., Matei A., Herrberger C., Hensel G., Kumlehn J., Mishra B., Sharma R., Thines M., Hüchelhoven R. & Doehlemann G. (2015). The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytol*. 206 (3): 1116-1126.
- Herdeiro R.S., Pereira M.D., Panek A.D. & Eleutherio E.C.A. (2006). Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 340 – 346.
- Herrero de Dios C., Román E., Alonso R. & Pla J. (2010). The role of MAPK signal

- transduction pathways in the response to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida albicans*: Implications in virulence. *Current Protein and Peptide Science*. 11: 693 – 703.
- Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M.J., Liers C. & Lundell T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 871 – 897.
- Holliday, R. (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genetics Research*. 2(1): 204-230.
- Huang Y.H., Shih C.M., Huang C.J., Lin C.M., Chou C.M., Tsai M.L., Liu T.P., Chiu J.F. & Chen C.T. (2006). Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 98: 577 – 589.
- Imley, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57(1):395-418.
- Iordachescu M. & Imai R. (2011). Trehalose and abiotic stress in biological systems. In *Abiotic stress in plants: mechanisms and adaptations*. (Arun K. Shanker & B. Venkateswarlu eds.). In Tech. Croatia. 215-234.
- Juárez-Montiel M., Ruiloba de León S., Chávez-Camarillo G., Hernández-Rodríguez C. & Villa-Tanaca L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Rev Iberoam Micol.* 28(2): 69-73.
- Kuang-Ren C. (2012). Stress Response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica*. Review Article. 1-18.
- Kuo D., Licon K., Bandyopadhyay S., Chuang R., Luo C., Catalana J., Ravasi T., Tan K. & Ideker T. (2010). Coevolution within a transcriptional network by compensatory *trans* and *cis* mutations. *Genome Research*. 20: 1672 – 1678.
- Kuranda K., Leberre V., Sokol S., Palamarczyk G. & François. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology*. 61 (5): 1147 – 1166.
- Lanver D. Berndt P., Tollot M., Naik V., Vranes M., Warmann T., Münch K., Rössel

- N., Kahmann R. (2014). Plant surface cues prime *Ustilago maydis* for biotrophic development. PLOS pathogens. 10 (7): e1004272.
- Lanver D., Tollot M., Schweizer G., Lo Presti L., Reissmann S., Ma Lay-Sun, Schuster M., Tanaka S., Liang L., Ludwig N. & Kahmann R. (2017). *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. Microbiology. Nature Reviews. 1-13
- Lehmann S, Serrano M, L'Haridon F., Tjamos S.E. & Mettraux J-P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. Phytochemistry. 112: 54-62.
- Lev S., Hadar R., Amedeo P., Baker S.E., Yoder O.C. (2005). Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plants signals. Eukaryot cell. 4(1): 443-454.
- Levin D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. Genetics. 189: 1145 - 1175.
- Lin C.H., Yang S.L. & Chung K.R. (2009). The *YAP1* homolog-mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. The American Phytopathological Society. 22 (8): 942 – 952.
- López C.A. (2016). Estudio funcional del gen *NTH1* que codifica la trehalasa neutra en el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Querétaro, Qro.
- Lowe R.G.T. *et al.* (2009). Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*. Fungal Genet. Biol. 46(1): 381-389.
- Lundell T.K., Mäkelä M.R. & Hildén K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes: ecological, functional and phylogenetic review. Journal Basic Microbiology. 50: 1 – 16.
- Lushchakk V.I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 153: 175 – 190.
- Marino D., Dunand C., Puppo A. & Pauly N. (2012). A burst of plant NADPH

- oxidases. Trends Plant Science. 17(1): 9-15.
- Matei A. & Doehlemann G. (2016). Cell biology of corn smut disease *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. Curr. Opin. Microbiol. 34(1): 60-66.
- Mayer F.L., Wilson D. & Tube B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Landes Bioscience. Virulence 4: 119 – 128.
- Mazzola D., Pimentel C., Caetano S., Amaral C., Menezes R., Santos C., Eleutherio E. & Rodrigues-Pousada C. (2015). Inhibition of Yap2 activity by MAPKAP kinase Rck1 affects yeast tolerance to cadmium. FEBS Letters. 589: 2841 – 2849.
- Merhej J., Thiebaut A., Blugeon C., Pouch J., Chaouche M., Camadro J.M., Le Crom S., Lelandais G. & Devaux F. (2016). A network of paralogous stress response transcription factors in the human pathogen *Candida glabrata*. Frontiers in Microbiology. 7(645).
- Molina L. & kahmann R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. The Plant Cell. 19(1): 2293-2309.
- Montibus M., Ducos C., Bonnin-Verdal M.N., Bormann J., Ponts N., Richard-Forget F. & Barreau C. (2013). The bZIP Transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and Trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. PLOS one. 8 (12): e83377.
- Morano K.A., Grant C.M. & Moye-Rowley S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell signaling and development. 190: 1157 – 1195.
- Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N. & Dunand C. (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. Journal of Integrative Plant Biology. 52(2): 195-204.
- Neil J.S., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. & Hancock J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany. 53(372): 1237-1247.

- Nevitt T., Pereira J., Azevedo D., Guerreiro P. & Rodrigues-Pousada C. (2004). Expression of *YAP4* in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Biochemical Journal*. 379: 367 – 374.
- Nikolaou E., Agrafioti I., Stumpf M., Quin J., Stansfield I. & Brown A.J.P. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology*. 9 (44): 1 – 18.
- Ngamskulrungraj P., Himmelreich U., Breger J.A., Wilson C., Chayakulkeeree M., Krockenberger M.B., Malik R., Heide-Marie D., Toffaletti D., Djordjevic J.T., Mylonakis E., Meyer W. & Perfect J.R. (2009). The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infection and Immunity*. 77 (10): 4584 – 4596.
- Paul S., Doering T.L. & Moye\_Rowley W.S. (2015). *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance. *Fungal Genetics and Biology*. 74: 1 – 9.
- Park J.I., Collinson E.J., Grant C.M. & Dawes I.W. (2005). Rom2p, the Rho1 GTP/GDP Exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 2529 – 2535.
- Passardi F., Theiler G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier N., Teixeira F., Margis-Pinheiro M., Ioannidis V., Penel C., Falquet L. & Dunand C. (2007). PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*. 68: 1605 – 1611.
- Pei-Ling Yu, Chih-Li W., Pei-Yin C. & Minn-Huey L. (2017). The *YAP1* homolog-mediated redox sensing is crucial for a successful infection by *Monilinia fructicola*. *Molecular Plant Pathology*. 18(6): 783-797.
- Petzold E.W., Himmelreich U., Mylokanis E., Rude T., Toffaletti D., Cox G.M., Liller J.L. & Perfect J.R. (2006). Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 74 (10): 5877 – 5887.
- Pimentel C., Caetano S.M., Menezes R., Figueira I., Santos C.N., Ferreira R.B., Santos M., Rodrigues-Pousada C. (2014). Yap1 mediates tolerance to

- cobalt toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840. 1977 – 1986.
- Qiao J., Liu W. & Li R. (2010). Truncated Afyap1 attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress. *Mycopathologia*. 170: 155 – 160.
- Redkar A., Matei A. & Doehlemann G. (2017). Insights into host cell modulation and induction of new cells by the corn smut *Ustilago maydis*. *Frontiers in Plant Science*. 8(899): 1-7.
- Ribeiro T.P., Fernandes C., Melo K.V., Ferreira S.S., Lessa J.A., Franco R.W.A., Schenk G., Pereira M.D. & Horn Jr. A. (2015). Iron, copper, and manganese complexes with *in vitro* superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 80: 67 – 76.
- Roetzer A., Gregori C., Jennings A.M., Quintin J., Ferrandon D., Butler G., Kuchler Karl., Ammerer G. & Schüller C. (2008). *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Molecular Microbiology*. 69 (3): 603 – 620.
- Rodrigues-Pousada C., Menezes R.A. & Pimentel C. (2010). The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. 27: 245 – 258.
- Ruiz-Herrera, J. León-Ramírez, C. Guevara-Olvera, L. & Cárabez-Trejo, A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*. 141: 695 – 703.
- Ruiz-Herrera. (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Revista Electrónica Nova Scientia*. 1 (1): 118-135.
- Ruiz-Herrera J. & León-Ramírez C.G. (2012). Development and dimorphism of the phytopathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis*. *Dimorphic fungi. Their importance as models for differentiation and fungi pathogenesis*. Chapter 8. 105 – 116.

- Sambrook J. & Russell. D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Press. Cold Spring Harbor, New York. 1
- Saville B.J, Donaldson M.E. & Doyle C.E. (2012). Investigating host induced meiosis in a fungal plant pathogen. Meiosis-Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity. Cap. 22. 411 – 448.
- Simonsen L.O., Harbak H. & Bennekou P. (2012). Cobalt metabolism and toxicology- A brief update. Science of the total Environment. 432: 210 – 215.
- Segal L.M. & Wilson R.A. (2018). Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. Fungal genetics and biology. 110: 1 – 9.
- Serneels J., Tournu H. & Van Dijck P. (2012). Tight control of trehalose content is required for efficient heat-induced cell elongation in *Candida albicans*. The Journal of Biological Chemistry 287: 36873 – 36882.
- Schilling L., Matei A., Redkar A., Walbot V. & Doehlemann G. (2014). Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. Molecular Plant Pathology. 15 (8): 780 – 789.
- Schwarz S. & Van Dijck P. (2016). Trehalose metabolism: A sweet spot for *Burkholderia pseudomallei* virulence. Virulence. 1(1): 1-3.
- Skibbe D.S, Doehlemann G., Fernandes J., Walbot V. (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. Science. 328: 89 – 92.
- Sun Y., Wang Y. & Tian C. (2016). bZIP transcription factor *CgAP1* is essential for oxidative stress tolerance and full virulence of the poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloesporioides*. Fungal Genetics and Biology. 95: 58 – 66.
- Temme N. & Tudzynski P. (2009). Does *Botrytis cinerea* ignore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress during infection? Characterization of *Botrytis* activator protein 1. The American Phytopathological Society. 22 (8): 987 – 998.
- Thammahong A., Puttikamonkul S., Perfect J.R., Brennan R.G & Cramer R.A. (2017). Central role of the trehalose biosynthesis pathway in the pathogenesis of human fungal infections: opportunities and challenges for

- therapeutic development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 81(2): e00053-16.
- Thompson M.E.H., Raizada M.N. (2018). Fungal pathogens of maize gaining free passage along the silk road. *Pathogens*. 7 (81): 1 – 16.
- Toone W.M., Kuge S., Samuels M., Morgan B.A., Toda T. & Jones N. (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: Requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev*. 12(1): 1453-1463.
- Toone W.M., Morgan B.A., Jones N. (2001) Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene*. 20: 2336-2346.
- Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C., Faure O., Biragui E., Canton E., Zimmermann K., Seaton S., Grillot R. (2004). Epidemiology of candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23: 317 – 322.
- Trevisol E.T., Panek A.D. De Mequita J.F., Eleutherio E.C. (2014). Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Biochim. Biophys Acta*. 1840: 1646 – 1650.
- Valko M., Morris H. & Cronin M.T.D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 1161 – 1208.
- Vargas L.A. (2013). El maíz, viajero sin equipaje. *An. Antropológicas* 48(1): 123-137.
- Voit E.O. (2003). Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology* 223: 55-78.
- Vollmeister E., Schipper K., Baumann S., Haag C., Pohlmann T., Stock J. & Feldbrügge M. (2012). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS. Microbiology Review* 36: 59-77.
- Wang W., Xiao Z.-D., Li X., Aziz K.E., Gan B., Johnson R.L. & Chen J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature Cell Biology*. 1 – 25.

- Wilson R.A., Jenkinson J.M., Gibson R.P. Littlechild J.A. Wang Z.Y. & Talbot N.J. (2007). Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *The EMBO Journal* 26: 3673 – 3685.
- Yang J., Zhang Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. 43: w174 – w181.
- Yingjiao S., Yonglin W. & Chengming T. (2016). bZIP transcription factor *CgAP1* is essential for oxidative stress tolerance and full virulence of the poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 95 (1): 58-66.
- Zaidi I., González A., Touzri M., Alvarez M.C., Ramos J., Masmoudi K., Ariño J. & Hanin M. (2012). The wheat MAP kinase phosphatase 1 confers higher lithium tolerance in yeast. *FEMS Yeast Research*. 12: 774 – 784.
- Zaragoza O., De Virgilio C., Pontón J. & Gancedo C. (2002). Disruption in *Candida albicans* of the *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology*. 148: 1281 – 1290.
- Zámocký M., Furtmüller P.G. & Obinger C. (2010). Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 500: 45-57.
- Zähringer H., Thevelein J.M. & Solomon N. (2000). Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Molecular Microbiology*. 35 (2): 397 – 406.
- Zilli D.M.W., Lopes R.G., Alves Jr S.R., Barros L.M., Miletto L.C. & Stambuk B.U. (2015). Secretion of the acid trehalase encoded by the *CgATH1* gene allows trehalose fermentation by *Candida glabrata*. *Microbiological Research*. 179: 12 – 19.
- Zhang Y. (2009). I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins*, 77 (Suppl 9): 100-113.

Zhang, C., Li Z., Zhang X., Yuan L., Dai H. & Xiao W. (2016). Transcriptomic profiling of chemical exposure reveals roles of Yap1 in protecting yeast cells from oxidative and other types of stresses. *Yeast* 33 (1): 5-19.

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
$\Delta$	Mutante
$\Delta\Delta$	Doble mutante
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
$\alpha$	alfa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ATH	Trehalasa ácida
$\beta$	beta
Cbx	Carboxina
C-terminal	Carboxilo terminal
CW	Calcoflúor white
pi	posterior a la infección
D.O.	Densidad óptica
dpi	días posteriores a la infección
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
g	gramo
mg	miligramo
$\mu\text{g}$	microgramo
mL	mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
G6P	glucosa-6-fosfato
gbm	grado biología molecular
hrs	horas
min	minutos
seg	segundos
$\text{H}_2\text{O}_2$	peróxido de hidrógeno
HCl	ácido clorhídrico

HygB	Higromicina B
km	Kanamicina
M	Molar
mM	Milimolar
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
NaCl	Cloruro de Sodio
N-terminal	Amino terminal
NTH	Trehalsa neutra
ORF	Marco de lectura abierto
OSR	Respuesta al estrés oxidativo
pb	Pares de bases
pH	Potencial de Hidrógeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pi	Fosfato inorgánico
RC	Rojo Congo
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
sp.	Especie
T6P	Trehalosa-6-fosfato
TBOOH	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
Tps1	Trehalosa-6-fosfato sintasa
Tps2	Trehalosa-6-fosfato fosfatasa
UDP-Glucosa	Glucosa-uridinfosfato
UTR	Región no traducida
WT	Cepa silvestre (Del inglés, "Wild Type")
®	Marca registrada

## APÉNDICE

### Preparación de medios de cultivo

#### Medio Completo (MC) para 1000 mL:

- 5 g Peptona
- 1.5 g Nitrato de Amonio
- 10 g Extracto de Levadura
- 62.5 mL Solución de Sales
- 10 g Glucosa
- 20 g Agar Baceteriológico (En caso de ser sólido)

#### Solución de Sales para 1000 mL:

- 16 g Fosfato de Potasio monobásico
- 4 g Sulfato de Sodio
- 8 g Cloruro de Potasio
- 2 g Sulfato de Magnesio heptahidratado
- 1 g Cloruro de Calcio dihidratado
- 8 mL Elementos Traza

#### Elementos Traza para 500 mL:

- 30 mg Ácido Bórico
- 70 mg Cloruro de Magnesio
- 200 mg Molibdato de Sodio dihidratado
- 50 mg Cloruro de Hierro
- 200 mg Sulfato de Cobre

#### Medio mínimo pH 3 para 1000 mL:

- 1 % (m·v<sup>-1</sup>) Glucosa
- 3 g Nitrato de Potasio
- 62.5 mL Solución de Sales

El pH se ajusta con el potenciómetro

**Medio mínimo pH 7 para 1000 mL:**

- 1 % (m·v<sup>-1</sup>) Glucosa
- 3 g Nitrato de Amonio
- 62.5 mL Solución de Sales
- 30 mM Tris·Hcl pH 7

El ph se ajusta con el potenciómetro

**Medio Completo (MC) adicionado con carbón activado para 1000 mL:**

- 5 g Peptona
- 1.5 g Nitrato de Amonio
- 10 g Extracto de Levadura
- 62.5 mL Solución de Sales
- 10 g Glucosa
- 20 g Agar Bacteriológico
- 10 g Carbón Activado

**Preparación de Soluciones****Extracción de ADN:**

- Tris EDTA (TE)
  - 10 mM Tris·HCl pH 8
  - 1 mM EDTA
  
- TSNTE
  - 2 % (m·v<sup>-1</sup>) Tritón X 100
  - 1 % (m·v<sup>-1</sup>) SDS
  - 100 mM NaCl
  - 10 mM Tris·HCl pH 8
  - 1 mM EDTA

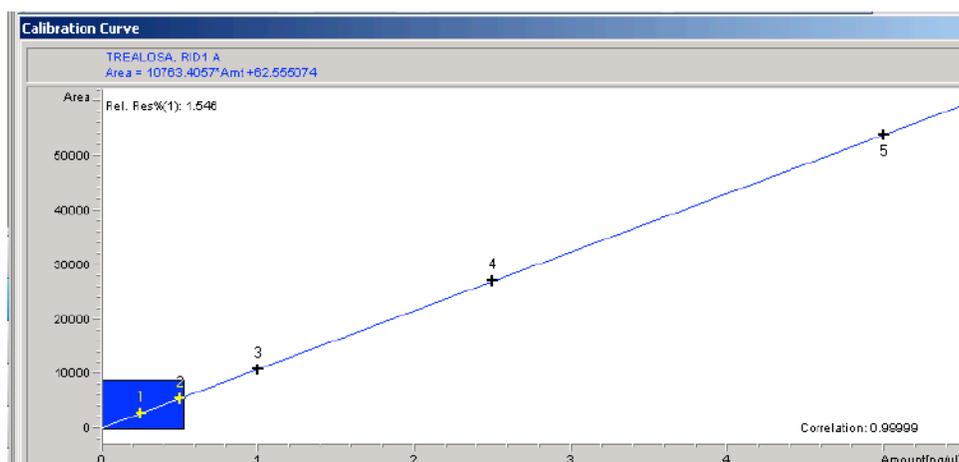
## Electroforesis:

Tris Ácido Acético EDTA (TAE)

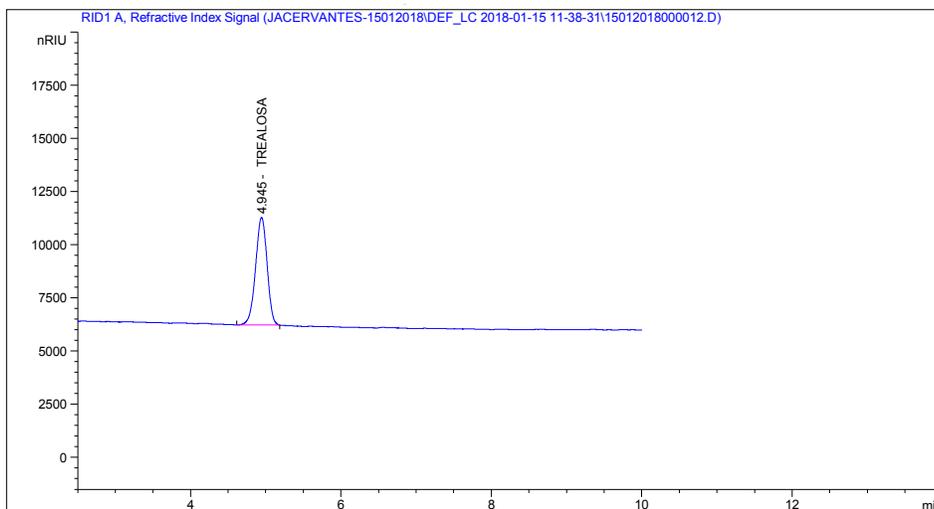
- 40 mM Ácido Acético
- 40 mM Tris·HCl pH 8
- 1 mM EDTA

## Curva de calibración para la cuantificación de trehalosa

Para la cuantificación de trehalosa que se realizó mediante HPLC en el Laboratorio de Cromatografía del LAN-PlanTECC, CINVESTAV-Irapuato. utilizamos una curva estándar con D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich® con las siguientes concentraciones 0.25 ng/μl, 0.5 ng/μl, 1 ng/μL, 2.5 ng/μL y 5 ng/μL con una correlación de 0.9999. En un HPLC Agilent 1200 bomba isocrática con detector de índice de refracción. La columna que se utilizó es de carbohidratos de Agilent 4.6 x 150 mm de 5 micrones con número de catálogo 843300-908, Acetonitrilo al 75%, a una temperatura de 30°C y un flujo del solvente de 1.5 ml/min isocrático 10 minutos.



Curva de calibración de la trehalosa. Se utilizó D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich® con las siguientes concentraciones 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 1 mg·mL<sup>-1</sup>, 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> y 5 mg·mL<sup>-1</sup> con una correlación de 0.9999.



Cromatograma estándar de la trehalosa. Se muestra el cromatograma de 5 mg·mL<sup>-1</sup> de D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich®.