

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS
DEL ZINC EN *Ustilago maydis* (STEVENSON Y JOHNSON, 1944)
(*Ustilaginales, Ustilaginaceae*).**

Por

M.C. ADRIANA MAYREL MARTHA PAZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Octubre, 2020

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS
DEL ZINC EN *Ustilago maydis* (STEVENSON Y JOHNSON, 1944)
(*Ustilaginales, Ustilaginaceae*).**



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Presidente



Dr. Arturo Espinoza Mata
Secretario



Dr. José Santos García Alvarado

Vocal



Dra. Susana Favela Lara

Vocal



Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS

DEL ZINC EN *Ustilago maydis* (STEVENSON Y JOHNSON, 1944)

(Ustilaginales, Ustilaginaceae).

Dirección de tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Director

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que colaboraron para la realización y revisión de este proyecto les agradezco por su valiosa aportación.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgar los fondos para llevar a cabo esta investigación.

DEDICATORIA

Con amor para mi esposo y familia.

ÍNDICE

	Agradecimientos.....	iv
	Dedicatoria.....	v
	Índice de tablas.....	x
	Índice de figuras.....	xi
	Lista de símbolos y abreviaturas.....	xiv
	Resumen.....	xvii
	Abstract.....	xviii
I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	3
2.1	El zinc: elemento esencial para la vida.....	3
2.1.1	Funciones biológicas del zinc	3
2.1.2	Problemática del zinc a nivel mundial.....	4
2.1.3	Problemática del zinc en México.....	5
2.2	Micorrizas: biofertilizantes de zinc.....	6
2.3	Transporte de zinc en los organismos.....	7
2.3.1	Transportadores de zinc de la familia ZIP (<i>Zrt-, Irt-like Proteins</i>).....	8
2.3.2	Transportadores de zinc de la familia CDF (Cation Diffusion Facilitator).....	9
2.3.3	Transporte de zinc en el retículo endoplásmico	10
2.3.4	Metalotioneínas quelantes de zinc (MTs)	10
2.3.5	Factor de transcripción Zap1p relacionado con el transporte de zinc	11
2.3.6	Mecanismos de homeostasis de zinc en hongos.....	12
2.3.7	Mecanismo de homeostasis ante la deficiencia y condiciones elevadas de zinc.....	12
2.4	<i>Ustilago maydis</i> : modelo de estudio de basidiomicetos.....	15
III.	Justificación.....	18
IV.	Hipótesis.....	19
V.	Objetivo del trabajo.....	20
VI.	Materiales y métodos.....	21
6.1	Microorganismos y su conservación.....	21

6.2	Plásmidos.....	22
6.3	Medios de cultivo.....	22
6.4	Pretatamiento y cultivo de los organismos.....	29
6.5	Protocolos de manipulación de ácidos nucleicos.....	29
6.5.1	Soluciones y reactivos.....	29
6.5.2	Protocolos generales de extracción y tratamiento de ácidos nucleicos.....	33
6.5.2.1	Extracción de ADN genómico.....	33
6.5.2.2	Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina...	34
6.5.2.3	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	35
6.5.2.4	Extracción de ARN.....	36
6.5.2.5	Digestión de la muestra de ARN.....	38
6.5.2.6	Gel de electroforesis para ARN.....	38
6.5.2.7	Tratamiento de ARN con DNasa.....	39
6.5.2.8	Desarrollo de qRT-PCR.....	39
6.5.2.8.1	Síntesis de ADNc a través de retro-transcripción (RT-PCR).....	39
6.5.2.8.2	Cuantificación relativa de la expresión genética por qPCR	40
6.5.2.8.2.1	qPCR para determinar la influencia de Rim101p en la expresión de transportadores de zinc	40
6.5.2.8.2.2	qPCR para identificar regulación de la expresión mediada por Rim101p en pH ácido.....	41
6.5.2.9	Ensayos de complementación en <i>S. cerevisiae</i> con genes de <i>Ustilago maydis</i> (Recapitulación de tesis de maestría).....	41
6.5.2.9.1	Amplificación de fragmentos UmZRT1 y UmZRT2.....	41
6.5.2.9.2	Elaboración de vectores de expresión	42
6.5.2.9.3	Transformación de levaduras con acetato de litio.....	43
6.5.2.9.4	Preparación de células calcio-competentes.....	44
6.5.2.9.5	Transformación bacteriana.....	45
6.5.2.10	Generación de mutantes en <i>Ustilago maydis</i>	45
6.5.2.10.1	Construcción de casetes de reemplazo de los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP.....	45
6.5.2.10.1.1	Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para desarrollo de mutantes.....	47
6.5.2.10.2	Formación de protoplastos.....	48

6.5.2.10.3	Transformación de protoplastos de <i>Ustilago maydis</i>	49
6.6	Cuantificación de composición elemental por ICP-OES.....	50
6.7	Análisis bioinformático.....	50
6.7.1	Obtención de secuencias y su análisis.....	50
6.8	Conformación proteica y topología de UmZrt1p y UmZrt2p.....	51
6.9	Predicción de la unión de factores de transcripción en los promotores de UmZRT1 y UmZRT2.....	51
6.10	Alineamiento de secuencias.....	52
6.11	Casetes de expresión y fusión con mCherry de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP.....	52
VII.	Resultados.....	53
7.1	Identificación y análisis de genes que codifican para transportadores de zinc en <i>U. maydis</i>	53
7.2	Las secuencias de aminoácidos UmZRT1p y UmZRT2p comparten similitud con las proteínas ZRT/IRT de otros organismos.....	57
7.3	Caracterización funcional de UmZRT1 y UmZRT2 mediante ensayo de complementación en <i>S. cerevisiae</i>	58
7.4	Caracterización funcional de los genes UmZRT1 Y UmZRT2 en <i>Ustilago maydis</i>	61
7.4.1	Generación de mutantes	61
7.5	Caracterización de la composición elemental mediante ICP- OES.....	68
7.5.1	Tratamiento de células para su caracterización.....	69
7.6	Análisis <i>in silico</i> de los promotores UmZRT1 y UmZRT2.....	72
7.7	Análisis de expresión de UmZRT1 y UmZRT2.....	73
7.8	Determinación de la regulación genética mediada por Rim101 en pH ácido.....	75
7.9	Localización celular de UmZrt1p, UmZrt2p y UmZapp en <i>Ustilago maydis</i>	76
7.9.1	Construcción de casetes de expresión y fusión con mCherry.....	76
7.10	Caracterización de la regulación del transporte de metales mediada por los factores de transcripción Rim101p y Nrg1p en	

	diferentes pH.....	77
VIII.	Discusión.....	86
IX.	Conclusiones.....	90
X.	Perspectivas.....	91
XI.	Bibliografía.....	92
XII.	Resumen biográfico.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Microorganismos usados en el estudio.....	21
Tabla 2.	Información de los plásmidos empleados en el desarrollo del proyecto.....	22
Tabla 3.	Componentes de reacción de PCR llevada a cabo con enzima Easy-A.....	42
Tabla 4.	Programa de PCR implementado tras el uso de enzima Easy-A.....	42
Tabla 5.	Reacciones realizadas para la amplificación por PCR con la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity.....	47
Tabla 6.	Programa general para la amplificación por PCR	48
Tabla 7.	Parámetros usados para la fusión de fragmentos por PCR.....	48
Tabla 8.	Diferencias en las predicciones de los dominios transmembranales de acuerdo al software usado.....	54
Tabla 9.	Sitios de unión para factores de transcripción con posible regulación de UmZRT1 y UmZRT2.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Desarrollo de casetes de reemplazo mediante la técnica de doble unión.....	46
Figura 2.	Representación gráfica del proceso de mutación mediante la técnica Split marker.....	47
Figura 3.	Predicción <i>in silico</i> de la topología de UmZrt1p y UmZrt2p en la membrana.....	53
Figura 4.	Predicción de dominios funcionales de UmZrt1p y UmZrt2.....	55
Figura 5.	Comparación de Zrt3p de <i>S. cerevisiae</i> con Um10685.....	56
Figura 6.	Comparación de UmZapp y Zapp de <i>S. cerevisiae</i>	57
Figura 7.	Comparación de la secuencias aminoacídicas de UmZrt1p y UmZrt2p.....	58
Figura 8.	Ensayos de complementación de la capacidad de transportar zinc en células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que expresan transportadores de zinc de <i>Ustilago maydis</i>	60
Figura 9.	Fragmentos amplificados para su fusión y obtención de los casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP.....	62
Figura 10.	Fusiones de los fragmentos y obtención de los casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP.....	63
Figura 11.	Casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP.....	63
Figura 12.	División de los casetes de reemplazo en 2 fragmentos para la técnica de división de marcador (split marker).....	64
Figura 13.	Protoplastos generados para su posterior transformación con los casetes divididos.....	65
Figura 14.	Detección del Marco de Lectura abierto de higromicina en Δ UmZRT1, Δ UmZRT2 y Δ UmZAP.....	66
Figura 15.	Caracterización del crecimiento de mutantes en medio completo sin y con higromicina.....	66
Figura 16.	Caracterización de Δ UmZRT1, Δ UmZRT2 y Δ UmZAP mediante la amplificación de los fragmentos P-Hyg y de Hyg-T	67
Figura 17.	Caracterización de mutantes por restricción enzimática.....	68
Figura 18.	Fenotipo de células de <i>Ustilago maydis</i> antes y después del estrés nutritivo.....	69
Figura 19.	Cuantificación de zinc por ICP-OES.....	70
Figura 20.	Diferenciación en crecimiento de Δ ZRT1, Δ ZRT2 y FB1 en	

	gradiente de [Zn]	72
Figura 21.	Expresión relativa de genes de BMA2 a pH ácido y neutro.....	74
Figura 22.	Expresión génica relativa de BMA2 en pH ácido usando como gen de referencia la subunidad ribosomal 40s	75
Figura 23.	Expresión génica relativa de BMA2 en pH ácido usando como gen de referencia la subunidad ribosomal 60s	76
Figura 24.	Estandarización de amplificación de fragmentos para casetes de expresión y fusión con mCherry	77
Figura 25.	Cuantificación de zinc mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1.....	79
Figura 26.	Cuantificación de hierro mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1.....	80
Figura 27.	Cuantificación de cobre mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1.....	81
Figura 28.	Cuantificación de potasio mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1.....	82
Figura 29.	Cuantificación de sodio mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1.....	83
Figura 30.	Cuantificación de magnesio mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1.....	85

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μl	Microlitros
™	Trade mark
®	Registrado
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
Cat	Catálogo
CDF	Cation Diffusion Facilitator
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico cadena complementaria
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
g	Gramos
h	hora, horas
Kb	Kilobases
L	Litro
LB	Luria-Bertani
lb	Libras
LZM	Low zinc médium (Medio bajo en zinc)
M	Concentración Molar
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
MOPS	Ácido mofolinopropanelsulfónico

MTs	Metalotioneínas quelantes de zinc
NCBI	National Center of Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
neg	Negativo
ng	Nanogramos
NTA	Ácido nitrilotriacético
num	Número
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa-Retrotranscriptasa
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
SOC	Medio enriquecido para bacterias calcio competentes
tip	Típica
Tm°	Temperatura de alineamiento
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
V	Voltz
v	Volumen
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
ZIP	Zrt-, Irt-like Proteins
ZREs	Zinc-responsive element
Zrt	zinc-regulated transporter

RESUMEN

Ustilago maydis es el miembro más estudiado del poco conocido Filo Basidiomycota, considerado un modelo de estudio. Importantes hallazgos sobre esta división han sido descubiertos debido a su relativo fácil manejo en condiciones de laboratorio. Con los acelerados cambios en el suelo alrededor del mundo, es imperativo conocer los mecanismos que usan los organismos para adaptarse y sobrevivir como lo hace *Ustilago*, transportando macro y micronutrientes como el zinc dependiendo de su biodisponibilidad. Diferentes familias de transportadores de zinc han sido reportadas en hongos ascomicetos, pero la más importante es la familia ZIP, compuesta por transportadores de membrana de alta y baja afinidad, que en algunos organismos son capaces de transportar hierro, Zrt1p y Zrt2p respectivamente y Zrt3p en la vacuola. La expresión de dichas proteínas es regulada por el factor de transcripción llamado Zap. En el presente estudio se identificaron los genes tipo ZRT1 y ZRT2 en *Ustilago maydis* y se descubrió que codifican para transportadores de alta y baja afinidad, sin presentar capacidad para el transporte de hierro. Todo esto apoyado por la fenotipificación de mutantes de esos genes en *Ustilago* y por la caracterización funcional midiendo el contenido intracelular de zinc en un rango de disponibilidad del metal por espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Esta función específica, también se confirmó mediante la complementación de una mutante de ZRT1 y ZRT2 de *Saccharomyces cerevisiae* con los genes de *U. maydis*. Además, mediante análisis de expresión se determinó que el factor de transcripción Rim101p no ejerce regulación sobre la expresión de ZRT1, pero si sobre ZRT2 en *Ustilago*. No fue posible identificar al transportador vacuolar tipo Zrt3p, pero si se encontró al posible regulador transcripcional Zap en *Ustilago maydis* y se realizó avance en la generación de la mutante. Finalmente se realizaron importantes progresos en las construcciones de casete de expresión y fusión con mCherry de los genes tipo ZRT1, ZRT2 y ZAP de *Ustilago*, para la futura localización celular de las proteínas codificadas. Con lo anterior se presentan los primeros datos sobre cómo este hongo Basidiomycota puede transportar el metal y adaptarse ante concentraciones bajas y altas de zinc.

ABSTRACT

Ustilago maydis is the most studied member of the lesser known Basidiomycota phylum, it is considered a study model and important findings have been discovered about this division because the relative easier culture and propagation of the fungus in lab conditions. With the accelerate rates of soil changes around the world, is imperative to know the mechanisms that organisms use to adapt and survive as *Ustilago* does transporting macro and micronutrients as zinc depending on it's bioavailability. Different families of zinc transporters have been reported in ascomycetes fungi, but the most important in terms of life organism's presence in the ZIP family composed by a high and low zinc affinity membrane transporters that in some organisms are also capable of iron transport, ZRT1 and ZRT2 respectively and Zrt3p in the vacuole. The expression of these proteins is regulated by the transcription factor called Zap. In the present study we identified ZRT1 and ZRT2 like genes in *Ustilago maydis* and discovered they codify for a high and low zinc affinity transporter, with no iron transport capacity. All this supported by mutant phenotyping of those genes in *Ustilago* and functional characterization measuring the intracellular zinc quantity over a range of zinc availability by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). We also confirmed this specific transporter's function by ZRT1 and ZRT2 *Saccharomyces cerevisiae* mutant complementation with *U. maydis* genes. Furthermore, through expression analysis was determined that the transcription factor Rim101p does not regulate the expression of ZRT1, but it does over ZRT2 in *Ustilago*. It was not possible to identify the Zrt3p like vacuolar transporter, but the possible transcriptional regulator Zap was found in *Ustilago maydis* and progress was made in the generation of the mutant. Finally, important progress was made in the construction of cassettes of expression of the ZRT1, ZRT2 and ZAP genes of *Ustilago* fused with mCherry, for the future cellular localization of the encoded proteins. Here we report a first insight of how this Basidiomycota fungus can transport and adapt through scarcity and increased zinc concentrations.

I. INTRODUCCIÓN

El interés en zinc ha aumentado durante la última década debido a su extensa deficiencia alrededor del mundo (ILZRO 1975; Leon et al. 1985; Sillanpaa 1990; Takkar y Walker 1993; Xie et al. 1998; Yakan et al. 2000; Singh 2001; Alloway 2008; CIMMYT 2011), afectando a todos los organismos; plantas y animales, incluidos los seres humanos. Se considera que una de las principales razones de deficiencia de micronutrientes en cerca de 3 mil millones de humanos son las dietas basadas en cereales con bajo contenido de zinc causando alrededor de 450,000 muertes de niños cada año (Hotz y Brown 2004; Welch y Graham 2004; Kramer y Clemens 2005; Eide 2006; Stein et al. 2007; Cakmak et al. 2010; Biesalski 2013). La deficiencia del metal está extendida en terrenos agrícolas y su biodisponibilidad se ve afectada por muchos factores como; contenido o concentración, pH, temperatura, proporción de materia orgánica, humedad del suelo, distribución de raíces y efectos de la rizosfera (Alloway 2004; Adiloglu y Adiloglu 2006; Alloway 2008, 2009). Una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de zinc para las plantas es su asociación con micorrizas, las cuales incrementan la superficie de toma de nutrientes (Cavagnaro 2008; Baslam et al. 2014; Raklami et al. 2019). Existe una gran cantidad de hongos basidiomicetos que forman asociaciones simbióticas con plantas (Jin et al. 2019) y la mayoría de los mecanismos usados por estos hongos para obtener nutrientes no han sido descritos hasta el momento. *U. maydis* es un hongo basidiomiceto que causa el carbón común del maíz y es usado también como modelo de estudio (Ruiz-Herrera 2008), al igual que otros organismos se enfrenta a las desafiantes condiciones ambientales, como variaciones en la temperatura, humedad, pH y biodisponibilidad de nutrientes, incluidos metales como el zinc (Kämper et al. 2006). El zinc es un micronutriente esencial para todos los organismos porque juega un papel clave en procesos celulares, como cofactor catalítico o estructural de numerosas proteínas, por mencionar algunos (Tapiero y Tew 2003; Kramer 2005; Figueiredo et al. 2012). Los organismos pueden verse afectados no sólo por las condiciones limitantes de zinc, si no también por su exceso. El contenido óptimo de zinc para el crecimiento celular es llamado "cuota de zinc" y en las levaduras se ha estimado que es de 10^7 átomos por célula (Eide 2006). En los últimos años, se ha encontrado que las células alcanzan el zinc y homeostasis intracelular general a través de la regulación de sistemas de transporte del mismo (Zhao y Eide 1996a,

1996b; MacDiarmid et al. 2000; Amich et al. 2014). Un importante grupo de transportadores de zinc y/o hierro conforman a la superfamilia ZIP. Los transportadores ZIP se encuentran en todos los niveles filogenéticos incluyendo bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Gaither y Eide 2001). Sus principales representantes son transportadores inicialmente localizados en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* Zrt1p y Zrt2p, mientras que Zrt3p se encuentra en la membrana vacuolar (MacDiarmid et al. 2000). Zrt1p tiene una alta afinidad por zinc, mientras que Zrt2p tiene una baja afinidad (Zhao y Eide 1996a, 1996b). Ambos son expresados en condiciones limitantes del metal. Su actividad y regulación han sido descritas en hongos ascomicetos, como *S. cerevisiae*. En medios de crecimiento escasos de zinc y a pH ácido, su expresión es inducida por el factor de transcripción Zap1p; sin embargo, esta inducción no ocurre en pH alcalino (Lamb et al. 2001; Serrano et al. 2002; Lamb y Mitchell 2003). En *Aspergillus nidulans* y en contraste con *S. cerevisiae*, la transcripción de los genes ortólogos ZRFA y ZRFB, se encuentra reducida en medios neutros o alcalinos escasos de zinc mediante el factor de transcripción PacCp (Amich et al. 2009). La caracterización de proteínas ortólogas en organismos del filo Basidiomycota es escasa debido a sus complejos ciclos biológicos y crecimiento en condiciones de laboratorio (de Mattos-Shibley et al. 2016). Aquí se reporta la identificación y caracterización de dos transportadores de zinc en *U. maydis*, expresados ante deficiencia de zinc; UmZRT1 (GenBank accession number MF177953) se comporta como un transportador de zinc de alta afinidad, mientras que umZRT2 (GenBank accession number MF177954) muestra propiedades de transporte de zinc con menor afinidad. En nuestras condiciones, ambas proteínas son incapaces de transportar hierro en *U. maydis*. Además, demostramos que el factor de transcripción Rim101p es requerido para la represión de umZRT2 en ambientes ácidos. Pero actúa como activador en pH neutro. Por otro lado, no se logró encontrar de manera *in silico* alguna proteína tipo Zrt3, pero se identificó un tipo Zap en *Ustilago* y se muestran los avances en la generación de la mutante del gen. Finalmente se expone aquí el progreso en la generación de casetes de expresión y fusión con mCherry de los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP. Nuestros resultados proveen nuevos hallazgos acerca de cómo *U. maydis* logra la homeostasis de zinc y ofrecen nuevas vías para mejorar la nutrición de este elemento fuera de los típicos sistemas fúngicos modelo como *S. cerevisiae*.

II. ANTECEDENTES

2.1 El zinc: elemento esencial para la vida

El zinc es requerido por todo organismo en cantidades pequeñas pero críticas, este micronutriente es el segundo más abundante en las células eucariotas, superado solamente por el hierro (Barret et al. 1992; Coleman 1992; Maret et al. 2001; King 2006). Se estima que más de 1200 proteínas contienen, unen, o transportan Zn^{+2} (Kramer y Clemens, 2005) y que este, es requerido para la actividad de más de 300 enzimas que abarcan las 6 clases existentes (McCall et al. 2000).

2.1.1 Funciones biológicas del zinc

El zinc es un nutriente esencial para todos los organismos, porque sirve como cofactor estructural, catalítico o co-catalítico de proteínas formando distintos tipos de enlaces en cada una de ellas (McCall et al. 2000; Auld 2001; Institute of Medicine, 2001; Amich 2010). Dichas proteínas pueden ser parte del citoplasma y organelos de células eucariotas incluyendo el núcleo, el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, vesículas secretoras y mitocondria (Eide 2006), el zinc al actuar como estabilizador estructural establece cuatro enlaces de coordinación con residuos peptídicos, estabilizando la estructura de la enzima o del sustrato en cuestión (Amich 2010). Debido a que este metal de transición es el único que no tiene actividad biológica redox (orbital *d10* lleno) y por contar con alta afinidad a proteínas, es el más adecuado para dicha función estructural (Williams 1987; Maret y Chem 2009). Las principales combinaciones del zinc con los ligandos de proteínas, incluyen el nitrógeno de la histidina, el oxígeno del aspartato o glutamato y el sulfuro de la cisteína, pero la más comúnmente observada es con la histidina seguida por la cisteína (Gregory 1993). Este metal es capaz de desempeñar muchas funciones fundamentales entre las principales se encuentran: la replicación, transcripción, procesamiento de RNA, expresión génica y diferenciación celular; esto es debido a que el Zn^{+2} es necesario para la actividad de todas las polimerasas de ácidos nucleicos, RNA-polimerasas, histonas deacetilasas, factores de splicing y enzimas involucradas en edición de RNA en la mitocondria y cloroplastos (Kramer y Clemens 2005), además forma parte de dominios tipo “*zinc-finger*” de unión a ADN presente en una amplia variedad y elevado número de factores de transcripción de

eucariotas (Iwata et al. 1999; Cario et al. 2000; Institute of Medicine 2001; Amich 2010). Por tanto, la deficiencia de zinc afecta en gran medida la capacidad de crecimiento, desarrollo y diferenciación de todos los organismos vivos (Prasad 1993).

2.1.2 Problemática del zinc a nivel mundial

La deficiencia de zinc en humanos es un problema nutricional en todo el planeta. Se estima que un tercio de la población mundial (33%), cerca de 2 mil millones de personas, son afectadas por la deficiencia del micronutriente, entre los rangos de 4 a 73% en diferentes países (Hotz y Brown 2004; Prasad 2020), principalmente en personas cuyas dietas son basadas en cereales con un nivel deficiente de Zn, entre estos, el trigo, el arroz y el maíz son los más afectados a nivel mundial (Welch y Graham 2004; Singh et al. 2005; Barker y Pilbeam 2015). Esta deficiencia es la quinta causa de muerte y enfermedad en el mundo en países en desarrollo (WHO 2002; Maret y Sandstead 2006; Maqbool 2019). De acuerdo a la organización mundial de salud cerca de 800,000 personas mueren anualmente debido a deficiencia de zinc, de los cuales 450,000 son niños menores de 5 años de edad (WHO 2002; Welch y Graham 2004; Cakmak et al. 2010). La deficiencia de zinc es más común en el sur y sureste de Asia, sur de África y centro América (Hotz y Brown 2004).

La primera y más importante necesidad para todo humano es el acceso a la comida y el suministro de comida está directa o indirectamente asociada con la agricultura. La deficiencia de zinc en los suelos es el problema global más extendido y afecta muchos suelos agrícolas, es considerado uno de los nutrientes más limitantes en cultivos después del nitrógeno y fósforo (Hafeez et al. 2013). La cantidad total de Zinc en suelos no está directamente relacionada con la cantidad disponible para plantas y viceversa, ya que las formas biodisponibles para plantas son iones libres (Zn^{+2} y $ZnOH^+$) (Broadley et al. 2012). En los suelos, la solubilidad de varios minerales decrece en el siguiente orden; $Zn(OH)_2$ (amorfo) > $Zn(OH)_2$ > $Zn(OH)_2$ > $Zn(OH)_2$ > $Zn(OH)_2$ > $ZnCO_3$ (smithsonita) > ZnO (zincita) > $Zn(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (willemita) > soil Zn > $ZnFe_2O_4$ (franklinita). El zinc suele formar complejos solubles con iones cloruro, fosfato, nitrato y sulfato, pero el sulfato neutro ($ZnSO_4^0$) y fosfato ($ZnHPO_4^0$) son las especies más importantes y contribuyen a la

concentración total de zinc en solución (Alloway 2008). Se estima que cerca de la mitad de los suelos cultivables en el mundo contienen cantidades reducidas de zinc biodisponible y como consecuencia se limita la absorción de zinc por las plantas, resultando en una disminución significativa tanto en productividad como en calidad nutricional del alimento (Alloway 2008; Cakmak 2008; Gonçalves Junior 2010).

Los principales factores que favorecen la deficiencia en la disponibilidad de zinc en suelos son variados; baja concentración total de zinc, pH alcalino, suelos arcillosos, textura arenosa, suelos calcáreos, inundaciones, suelos con temperaturas frías, contenido de materia orgánica, altas concentraciones de sodio, magnesio y/o bicarbonato (también en agua de riego), cultivo intensivo, el uso de fertilizantes pobres en micronutrientes y altos en fósforo y nitrógeno, y efectos de la rizosfera (Alloway 2004, 2008, 2009; Adiloglu y Adiloglu 2006; Cakmak 2011).

Por otra parte, la toxicidad por zinc está menos extendida y ocurre en áreas expuestas a la contaminación industrial o por la aplicación excesiva de lodos de depuradora en plantas de tratamiento de agua residual (Broadley et al. 2007).

2.1.3 Problemática del zinc en México

Todos los suelos agrícolas en México son deficientes en zinc, aunque es más común en las regiones altamente erosionadas de Querétaro, Sonora y Sinaloa (Alloway 2008). El maíz es el cultivo más grande en México y es el que tiene mayor probabilidad de ser cultivado en suelos deficientes en zinc. Las tortillas de maíz son la principal fuente de ingesta calórica para los mexicanos; por lo tanto, el maíz es el cultivo más consumido en México (Rosado 2003; USDA Foreign Agricultural Service Mexico, 2012. www.mexico-usda.com.mx). Se estima que el >20% de la población en México tiene deficiencia de zinc (Mejía-Rodríguez et al. 2013). La prevalencia de deficiencia de zinc varía por edad, con tasas de 29.2%, 27.5% y 26.4% en niños de 1-2, 3-4, 5-6 años respectivamente (Morales et al. 2012). Los más deficientes son los niños de 0 a 4 años. Este es el mismo grupo de edad que tiene mayor riesgo de morir por diarrea o neumonía, enfermedades que podrían prevenirse agregando zinc a las dietas. Mujeres Mexicanas de entre 12 a 49 años de edad también presentaron altas tasas de deficiencia de zinc (28-56%) (Mejía-Rodríguez et al. 2013; Cediél et al. 2015).

En el aspecto económico, la deficiencia de zinc afecta a México, ya que es un desorden común en árboles de nuez. México es el segundo mayor productor de nueces en el mundo, con un área plantada de 113,000 hectáreas, generando el 40% de la producción mundial y 56% del volumen comercializado internacionalmente (SIAP 2016). El área plantada en el estado de Chihuahua es cerca del 70% del total nacional y esto produce 80,000 toneladas de nueces. Un factor limitante en la producción de nuez en esta región es la baja biodisponibilidad de zinc en los suelos alcalinos (calcáreos), que son bajos en materia orgánica (Ojeda-Barrios et al. 2012, 2014). Esto representa un desafío para los mexicanos en la implementación de zinc de una manera más biodisponible para las plantas y como consiguiente para los humanos.

2.2 Micorrizas: biofertilizantes de zinc

Los organismos micorrícicos son un grupo heterogéneo de hongos de diversos taxones, asociados las raíces de alrededor del 90% de todas las especies de plantas, incluyendo arboles forestales, hierbas silvestres y muchos cultivos. Ambos socios se benefician de la relación: los hongos micorrícicos mejoran el estado nutricional de sus plantas huésped, influyendo en la nutrición minerales como Zn, P, NH_4^+ , NO_3^- , Cu y K (Cavagnaro 2008), la absorción de agua, el crecimiento y la resistencia a las enfermedades, mientras que a cambio, la planta huésped es necesaria para el crecimiento y la reproducción de los hongos (Smith y Read 2008), ya que basan su ciclo de vida en la absorción de carbono orgánico de una planta. (Heinonsalo et al. 2017; Peay et al. 2016).

Los hongos micorrícicos desarrollan una extensa red de hifas en el suelo, la bien conocida red de madera (Helgason et al. 1998), que puede conectar comunidades enteras de plantas que ofrecen una transferencia horizontal eficiente de nutrientes. Las micorrizas desarrollan áreas especializadas, llamadas interfaces simbióticas, para interactuar con la planta huésped (Bonfante 2001; Harrison 2005; Parniske 2008). Los hongos micorrícicos se pueden dividir en dos grupos principales: endófitos aseptados como Glomeromycota, o Asco- y Basidiomycota septados (Smith y Read 2008). Este último grupo está conformado por cientos de basidiomicetos y debido a que *Ustilago maydis* corresponde a este filo, el estudio de sus mecanismos de transporte de nutrientes tiene gran importancia para su extrapolación a los mecanismos utilizados por los hongos formadores de este tipo de

asociaciones. Comúnmente, las clasificaciones de micorrizas reflejan aspectos anatómicos e identifican dos amplias categorías, denominadas ectomicorrizas (EM) y endomicorrizas, dependiendo de si el hongo coloniza los espacios intercelulares de la raíz o se desarrolla dentro de las células. Las endomicorrizas se dividen en orquídeas, ericoides y micorrizas arbusculares (AM) (Smith y Read 2008).

En suelo con bajas concentraciones de Zn, las micorrizas pueden mejorar la nutrición del metal en la planta y, por lo tanto, el valor nutritivo de los cultivos. En suelos con alto contenido de Zn, la colonización de raíces puede resultar en una reducción de la acumulación de Zn (y otros metales) en tejidos vegetales (Christie et al. 2004; Hildebrandt et al. 2006; Zhu et al. 2001). Esto ha sido documentado en numerosos estudios, tal como lo hicieron Dehn y Schüepp (1989); Sembraron plantas de lechuga inoculadas con 3 aislados de *Glomus* en suelos con altas y bajas concentraciones de Zn y Cd. Ellos encontraron que la infección con micorrizas aumenta la toma de metales por las raíces, pero no por los brotes. En suelos altamente contaminados, las concentraciones de metales aumentaron en las raíces, pero decrecieron en los brotes en comparación de las plantas no micorrizadas.

Pese a lo mencionado anteriormente, el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la adquisición, transporte, almacenamiento y utilización de Zn en el nivel molecular en micorrizas es limitado (Broadley et al. 2007; Burleigh et al. 2003), y el estudio de un modelo basidiomiceto amplía el estado del arte en el conocimiento de dichos mecanismos.

2.3 Transporte de zinc en los organismos

Todo organismo se enfrenta a condiciones cambiantes en el medio en que se desarrolla, por lo que debe valerse de diferentes estrategias que lo lleven a su supervivencia y éxito ante situaciones desafiantes, y la adquisición de metales suele ser una de ellas, por lo que las células se ven en la necesidad de regular las concentraciones intracelulares de los mismos, entre ellos el zinc, para ello requieren de mecanismos de transporte, para permitir su almacenamiento, distribución y la modulación de su posible toxicidad.

Toda célula necesita de un contenido total de zinc para su óptimo crecimiento, a lo cual se le denomina “cuota de zinc” (Eide 2006). Se ha observado

una similitud remarcada en la concentración de zinc requerida entre los diferentes tipos celulares: En *Escherichia coli*, la cuota de zinc es aproximadamente 10^5 átomos de zinc por célula (Outten y O'Halloran 2001). La cuota de zinc para levaduras está estimada en aproximadamente 10^7 átomos por célula, mientras en muchos tipos celulares de mamíferos en cultivo se requiere de alrededor de 10^8 átomos por célula (Palmiter y Findley 1995; Suhy et al. 1999; MacDiarmid et al. 2000). Realizando un ajuste en relación al volumen de los diferentes tipos de células, la concentración celular total del ion corresponde a valores dentro de 0.1-0.5 mM. Dicha similitud en los niveles del metal refleja los papeles conservados del zinc en la bioquímica celular, por lo que si se observa desde la perspectiva celular, el zinc no es un elemento traza como comúnmente es llamado (Outten y O'Halloran 2001), sino un elemento importante en los procesos metabólicos de la célula, tanto su exceso como su déficit, pueden tener efectos dramáticos en la fisiología celular (Koh et al. 1996; Amich 2010). Cuando la concentración de zinc desciende por debajo de un valor mínimo, el crecimiento celular se detiene. Por el contrario, un exceso de zinc puede resultar tóxico para las células al inactivar proteínas interaccionando o compitiendo con otros iones metálicos por sus sitios activos (Gaither and Eide, 2001). Debido a ello, el aflujo, movilidad, almacenamiento y eflujo del metal debe ser ampliamente regulado (Eide 2009). Por lo cual, las células están dotadas de un sistema para lograr la homeostasis del metal y en *S. cerevisiae* se ha encontrado que este sistema está formado por

2.3.1 Transportadores de zinc de la familia ZIP (*Zrt-, Irt-like Proteins*).

A los miembros mamíferos de esta familia se les ha dado la designación sistemática “SLC39” (Eide 2004). Una característica clave de la familia ZIP es que, sin ninguna excepción, estas proteínas transportan zinc y/u otro ion metálico como sustrato del espacio extracelular o lumen organelar en el citoplasma, probablemente mediante un antiportador Zn^{+2}/H^+ (Balaji y Colvin 2005). La mayoría de las proteínas ZIP tienen ocho dominios transmembranales y topologías similares con los extremos N- y C-terminales localizados hacia el espacio extracelular de la membrana plasmática o hacia el interior del orgánulo. Muchos miembros también presentan una región rica en histidinas localizada entre los dominios transmembranales 3 y 4, que probablemente se encuentra implicada en el transporte de zinc o en su regulación. Los transportadores ZIP son encontrados en todos los niveles filogenéticos

incluyendo bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Gaither y Eide 2001). Existen cuatro subfamilias de proteínas ZIP: subfamilia I (agrupa fundamentalmente proteínas de plantas y hongos), subfamilia II (un pequeño grupo de proteínas de mamíferos y nematodos), subfamilia *gufA* (incluye proteínas de procariotas y de eucariotas) y la subfamilia LIV-1 (exclusiva de eucariotas) (Gaither y Eide 2001; Eide 2006; Amich 2010). Los principales representantes de este tipo de transportadores son Zrt1p y Zrt2p, los cuales han sido bien caracterizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se encuentran posicionados en la membrana plasmática. Zrt1p (zinc-regulated transporter) es un transportador de alta afinidad a Zn^{+2} y es inducido en condiciones de bajos niveles del metal. En *S. cerevisiae* el gen ZRT1 se encuentra localizado en el cromosoma XII y codifica para una proteína de 376 aminoácidos. Zrt2p es un sistema para la toma de Zn^{+2} que tiene baja afinidad por el sustrato, y es activo en células repletas de zinc. También el gen codificante se encuentra en el cromosoma XII (Zhao y Eide 1996a y 1996b). Por otra parte, se ha encontrado un transportador muy similar a los anteriormente citados, Zrt3p, que bombea zinc de la vacuola al citoplasma, donde este puede ser utilizado, bajo condiciones limitadas del metal (Eide 2009; MacDiarmid 2000).

2.3.2 Transportadores de zinc de la familia CDF (Cation Diffusion Facilitator).

En los mamíferos los elementos de transporte de zinc han sido nombrados “ZnT” y se les ha dado el nombre sistemático de SLC30 (Palmiter y Huang 2004). La característica clave de esta familia es que transportan zinc y/u otro ion metálico del citoplasma al lumen de organelos o hacia afuera de la célula. De esa manera, las proteínas CDF trabajan de forma opuesta a los transportadores ZIP, participando en la detoxificación y/o acúmulo de metales. Parece ser que la función es realizada a favor del flujo que genera un antiporter Zn^{+2}/H^{+} (Colvin et al. 2000; Ohana et al. 2009; MacDiarmid et al. 2002; Chao y Fu 2004). Se caracterizan por tener seis dominios transmembranales, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol. Al igual que las proteínas ZIP poseen una extensa región citoplasmática entre los dominios transmembranales IV y V, donde muchos miembros de la familia CDF tienen motivos ricos en histidinas. Los transportadores CDF también son encontrados en todos los niveles filogenéticos (Gaither y Eide, 2001). Los miembros de este grupo se han clasificado en tres subfamilias (I, II y III), la subfamilia I está comprendida principalmente por procariotas, mientras que las

subfamilias II y III contienen miembros tanto procariotas como eucariotas, siendo su clasificación con base a la similitud de las secuencias de aminoácidos (Gaither y Eide, 2001; Eide 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación con base al metal que transportan, formando las subfamilias: Fe/Zn-CDF, Mn-CDF y Zn-CDF (Montanini et al. 2007; Amich 2010).

Algunos integrantes de esta familia de transportadores son los siguientes: Zrc1p y Cot1p: son proteínas que se han caracterizado en *S. cerevisiae* y predominantemente se encuentran en la membrana vacuolar, por lo que se encargan del transporte de zinc del citoplasma a dicho organelo (Paulsen y Saier 1997; Li y Kaplan 1998).

2.3.3 Transporte de zinc en el retículo endoplásmico.

Msc2p y Zrg17p: son una ruta de entrada de zinc al retículo endoplásmico, donde mantienen la función de dicho compartimento y probablemente de otros organelos de la vía secretoria. Estos solamente son activos como complejos heterodiméricos, y se sabe que la actividad de Msc2/Zrg17 solamente se activa ante condiciones limitantes de zinc (Ellis et al. 2005; Fukunaka et al. 2009).

2.3.4 Metalotioneínas quelantes de zinc (MTs).

Son proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de cisteínas y muy bajo o nulo de histidinas y aminoácidos aromáticos (Vasak y Kagi 1994) y forman enlaces tiol con iones metálicos, para secuestrar metales pesados tóxicos (ej. cadmio, mercurio, etc.), almacenar metales esenciales como el cobre y zinc, y para regular metales dependientes de procesos fundamentales para vías celulares (Vasak y Hasler, 2000). Tienen una gran variedad en secuencias, aunque siempre poseen características estructurales que les permiten unirse fuertemente a metales (particularmente Cu^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2}). Las MTs participan en la homeostasis del zinc mediante la donación o secuestro del metal y/o control redox, regulando así el proceso de detoxificación y el metabolismo. Este tipo de quelantes han sido aislados de varios organismos incluyendo plantas, vertebrados, invertebrados, hongos, eucariotas unicelulares y algunos procariotas (Coyle et al. 2002).

2.3.5 Factor de transcripción Zap1p relacionado con el transporte de zinc.

Siempre ha de existir al menos un factor regulador que active o inhiba la expresión de los genes relacionados con la homeostasis del zinc en función a la concentración ambiental de este metal (Gaither y Eide 2001). Uno de los factores de transcripción más importantes implicados en dicha regulación es Zap1p, que está formado por 880 aminoácidos (93 kDa) y siempre reside en el núcleo, bajo cualquier condición de zinc (Bird et al. 2000). Tiene uno de los dominios clásicos de los factores de transcripción de dedos de zinc (ZnF1-ZnF7), formando los cinco más próximos al extremo carboxilo (ZnF3-ZnF7) el dominio de unión a ADN (Amich 2010). Además, Zap1p en su extremo amino contiene 2 dominios de activación, AD1 y AD2 que activan la transcripción propia (Bird et al. 2000); AD1 se encuentra localizada en la mitad de la región N-terminal de las proteínas y contiene dominios de unión a zinc dentro de una región aminoacídica denominada ZRDAD1 (Herbig et al. 2005). AD2 está formada por una región de dos dedos de zinc regulados por este metal, denominados ZF1 y ZF2, estos al unir zinc se pliegan formando una estructura tridimensional única, que previene que AD2 reclute co-activadores para los promotores de ZAP1, una característica importante es que la unión de zinc a estos sitios es muy lábil, por lo que la regulación de AD2 involucra un ciclo constante de unión y desprendimiento del metal, permitiendo de esa manera detectar constantemente cambios en las concentraciones intracelulares de zinc (Bird et al. 2006; Wang 2006; Qiao et al. 2006), de manera que Zap1p se activa cuando la concentración de zinc es baja y se inactiva si aumenta. Cuando Zap1p está activo es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN, presentes en los promotores de sus genes diana, denominadas elementos de respuesta a zinc o ZREs (*Zinc-responsive element*). La secuencia consenso de estos elementos es 5'-ACCTTNAAGGT-3 (Zhao et al. 1998; Lyons et al. 2000). Zap1p actúa como activador transcripcional e incrementa la expresión de genes cuando los niveles de zinc son bajos, en otros pocos casos actúa como represor. Adicionalmente, pueden existir otros factores reguladores de la expresión de los genes diana respondiendo a condiciones ambientales distintas a la disponibilidad de zinc, pero que afectan a la biodisponibilidad de metal. Un ejemplo de esto es la regulación por pH (mediante Rim101p) antes descrita, que presentan los transportadores ZIP de *A. fumigatus* (Vicente-franqueira et al. 2005).

2.3.6 Mecanismos de homeostasis de zinc en hongos

El transporte de zinc hacia dentro de las células y de sus organelos y fuera de ellos, es muy importante para lograr concentraciones intracelulares óptimas del metal, por lo que se requieren proteínas transportadoras que atraviesen las membranas para facilitar su movimiento. Con el paso de los años, se han identificado los papeles que desempeñan muchos transportadores en diferentes organismos y tipos celulares. La mayoría de los cuales pertenecen a la familia de transportadores ZIP con algunas excepciones. Pero la homeostasis del zinc ha sido más estudiada en *Saccharomyces cerevisiae* (Eide 2003, 2009). En esta levadura se han encontrado proteínas pertenecientes a todas las clases de transportadores que forman los sistemas de homeostasis de zinc, tales como transportadores ZIP (Zrt1p, Zrt2p, Zrt3p y Ke4), transportadores CDF (Zrc1p, Cot1p, Msc2p y Zrg17p), una metalotioneína (Csr5) y un factor de transcripción regulador (Zap1p) (Eide 2009; Amich 2010).

2.3.7 Mecanismo de homeostasis ante la deficiencia y condiciones elevadas de zinc.

La primera respuesta de un organismo ante variaciones de zinc es a nivel transcripcional, siendo Zap1p quien desempeña el papel principal, comenzando con la activación de su propia transcripción, resultando en el incremento de los niveles de la proteína, lo cual repercute en las respuestas a zinc de otros genes diana de Zap1p (Eide 2009; Amich 2010). Posteriormente, el primer paso en la biología celular del zinc, es el transporte del ion a través de la membrana hacia el interior de la célula. Por lo que tras la activación de Zap1p, se incrementa la expresión de transportadores involucrados en la toma de zinc y una gran cantidad de diferentes proteínas que cumplen con dicha función (Eide 2006). El sistema primario para la adquisición de zinc regulado por Zap1p, está conformado por transportadores Zrt1p, los cuales tienen mayor afinidad por Zn^{+2} (Zhao y Eide 1996a, 1997) y son requeridos en condiciones limitantes del mismo (Zhao y Eide 1996a), en estas condiciones, su expresión se eleva aproximadamente 100 veces más sobre niveles de expresión de células repletas del metal (Zhao y Eide 1996b), ya que al aumentar las concentraciones intracelulares del metal, la expresión de Zap1p se reprime, tras la unión de zinc a la proteína. Un segundo gen: ZRT2, es tanto inducido como reprimido por Zap1p (Bird et al. 2004), la proteína codificada por este tiene menor

afinidad por el Zn^{+2} libre y juega un papel importante en la adquisición del metal en condiciones limitantes de zinc menos severas (Zhao y Eide 1996b). La expresión de Zrt2p se incrementa bajo condiciones de mediana deficiencia de zinc, pero decrece a niveles bajos en severa deficiencia, dicha regulación es debido a la presencia de 3 ZREs en el promotor de ZRT2. Dos sitios de afinidad de Zap1, ZRE1 y ZRE2 están localizados río arriba de la caja TATA y median la activación dependiente de Zap1p. El tercer ZRE, ZRE3, presenta una afinidad 10 veces menor a Zap1p que los otros sitios ZREs presentes en el promotor y está localizado río abajo de la caja TATA cerca del sitio de inicio de la transcripción. ZRE3 es esencial para la represión de la expresión de ZRT2. Bajo condiciones moderadas de deficiencia de zinc, Zap1p se une a ZRE1 y ZRE2 y activa la transcripción. Bajo severa deficiencia, cuando los niveles de Zap1p aumentan debido a la autorregulación previamente descrita, Zap1p también se une a ZRE3 y bloquea la expresión de ZRT2 (Bird et al. 2004), este patrón de expresión asegura que el transporte de baja afinidad mediado por Zrt2p no sea expresado en momentos donde su contribución de toma de zinc es innecesaria (Eide 2009).

Se han encontrado otros transportadores con menos afinidad por zinc en la membrana plasmática, uno de ellos es Fet4p, inducido por Zap1, el cual además de zinc, transporta cobre y hierro (Waters y Eide 2002). Otro sistema de toma del ion es Pho84p (Jensen et al. 2003), no inducido por Zap1, que tiene alta afinidad por fosfatos y menor por zinc en condiciones limitantes de fosfato, por lo que este sistema solo desempeña su papel en la toma de zinc ante dichas situaciones (Bun-Ya et al. 1991). Una vez dentro de la célula se activan mecanismos para evitar la toxicidad por exceso del zinc, incluyendo la unión del mismo a macromoléculas citoplasmáticas denominadas metalotioneínas, que con su función quelante logran secuestrar el metal, contribuyendo a la detoxificación y dejándolo disponible ante la deficiencia del mismo (Hamer 1986).

Otra estrategia para evitar daño celular por exceso del metal es su almacenamiento dentro de diferentes compartimientos. El zinc cumple con funciones importantes dentro de organelos, uno de ellos es el retículo endoplasmático (RE), donde se da el plegamiento inicial y las modificaciones postraduccionales de proteínas, siendo este metal indispensable para dichos procesos. Los transportadores de zinc responsables de repartir el zinc en vías secretorias, pertenecen a la familia

CDF. En levaduras el complejo Msc2/Zrg17 media el transporte de zinc al retículo endoplasmático, bajo condiciones limitantes de zinc (Ellis et al. 2004, 2005; Li y Kaplan 2000). Otro transportador localizado en el RE es la permeasa Ke4, la cual tiene función bidireccional, de forma que introduce o retira zinc según las necesidades del momento. En cuanto a la regulación de su expresión, ZRG17 está controlado por Zap1p, mientras que MSC2 y KE4 no lo están (Ellis et al. 2005; Kumanovics et al. 2006). Por otra parte, también se ha observado que los transportadores Zrc1p y Cot1p contribuyen al aporte de Zn^{+2} en dicho organelo, en etapas tempranas de la vía secretoria poco después de su síntesis y luego migrar a la vacuola (Ellis et al. 2004). Las vacuolas sirven como el principal sitio de almacenamiento y detoxificación de zinc (Ramsay y Gadd, 1997; Ma et al. 2005). Cuando los sistemas de transporte para el secuestro vacuolar de zinc son eliminados, el máximo nivel de tolerancia de zinc por la célula cae ~100 veces (Kamizono et al. 1989; Conklin et al. 1994, MacDiarmid et al. 2003). Existen situaciones a las que se enfrentan los organismos donde se ven privados del metal por periodos prolongados “Zinc Shock”, por lo que se da una sobreexpresión de los transportadores de alta afinidad Zrt1p y al presentarse suministros esporádicos de zinc y ser transportado hacia el interior celular, dichas células deficientes, tienden a acumular sustanciales cantidades del metal en organelos como la vacuola, antes de que los mecanismos transcripcionales y postraduccionales que regulan a ZRT1 apaguen sus mecanismos de toma de zinc a través de él (Eide 2006, 2009). El zinc secuestrado dentro de la vacuola además de evitar que la célula se intoxique ante el incremento intracelular del metal, también sirve como reserva y transporte del mismo de manera segura hacia el citoplasma bajo condiciones de deficiencia del ion, así posee suficientes reservas para el desarrollo durante muchas generaciones en ausencia de algún aporte exógeno (Simm et al. 2007). La toma de zinc en la vacuola de la levadura es mediada por dos miembros de la familia CDF; Zrc1p y Cot1p. Zrc1p es un transportador Zn^{+2}/H^{+} que permite la acumulación de zinc desde el citoplasma hacia la vacuola a favor del gradiente de protones generado por las ATPasas vacuolares (MacDiarmid et al. 2002). Cot1p puede actuar de una manera similar, aunque sus propiedades bioquímicas no han sido analizadas. La liberación de zinc de la vacuola al citosol bajo condiciones de deficiencia de zinc esta mediada por Zrt3p, un miembro de la familia de transportadores ZIP (MacDiarmid et al. 2000). La expresión de Zrt3p aumenta ante condiciones de bajo zinc para facilitar la movilización vacuolar del

metal (Eide 2006). Por otra parte, se han encontrado estructuras muy similares a las vacuolas y se les ha nombrado “zincosomas”, los cuales pueden servir como buffer citosólico para lograr una homeostasis intracelular de zinc, tal como se describió en las vacuolas, el almacenaje del metal en dichas estructuras puede ser movilizado después de una deficiencia. El almacenamiento vesicular de zinc al igual que en levaduras (Li y Kaplan 2000; Devirgiliis et al. 2004), puede existir en células de mamíferos (Coyle et al. 1994; Palmiter 1996; Nasir et al. 1999; Ho et al. 2000; Li y Kaplan 2000; Burdette et al. 2001; Michalczyk et al. 2002; St Croix et al. 2002), y su acumulación en los zincosomas es dependiente de Zrt1p, pero no de Zrc1p o Cot1p (Devirgiliis et al. 2004).

Mediante todos los procesos llevados a cabo por la célula, a pesar de que los niveles de zinc lleguen a ser altos en el espacio intracelular (Palmiter y Findley 1995), muy poco zinc se encuentra presente en forma “libre” o biológicamente útil. Se estima que las concentraciones de zinc libre dentro de la célula son en rango nanomolar (Suhy y O’Halloran 1995).

Existe otro mecanismo para lograr la homeostasis celular del zinc y se da a nivel postraduccional (Gaither y Eide 2001). Como ya se describió anteriormente en *S. cerevisiae* ante condiciones con bajas concentraciones de zinc, el transportado Zrt1p es estable en la membrana plasmática, pero al exponerse a cantidades extracelulares elevadas del metal, se desencadena la rápida pérdida de la actividad y de la síntesis de Zrt1p, dicha inactivación ocurre por endocitosis de la proteína, tras ser ubiquitinada (Gitan y Eide 2000), y posteriormente degradada a nivel vacuolar (Gitan et al. 1998). Por lo que dicho sistema previene la sobreacumulación de este metal potencialmente tóxico (Gaither y Eide 2001).

2.4 *Ustilago*: modelo de estudio de basidiomicetos

Es un hongo basidiomiceto denominado carbón del maíz, el cual pertenece al subfilum Ustilaginomicota y orden Ustilaginales (James et al. 2006), que constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 1200 especies; causales de enfermedades conocidas comúnmente como carbones (Martínez-Espinoza et al. 2002; Agrios 2005; Guerra 2005; Ruiz-Herrera 2008) Existen alrededor de 1000 especies de carbones que atacan a las angiospermas de más de 75 familias (Agrios 2005; Sharma 2014) pero *U. maydis* solo es patógeno en

el maíz (*Zea mays*) y de su probable ancestro el teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*) (Bolker 2001), causando e induciendo la formación de tumores o agallas en diferentes partes de la planta, enfermedad conocida como huitlacoche o carbón común del maíz (La ambrosia de los aztecas), los tumores generados en esta infección, son considerados una delicia culinaria en diferentes regiones del centro de México y se utilizan como alimento en diversos platillos desde el periodo precolombino (Ruíz-Herrera y Martínez 1998). En contraste con dicho uso benéfico de la enfermedad, *U. maydis* también da lugar a pérdidas económicas considerables en los cultivos comerciales de maíz (Martínez-Espinoza et al. 2002; Agrios 2005; Chavan y Smith 2014) ya que el carbón del maíz aparece donde quiera que se cultive la planta, aunque con mayor frecuencia en áreas cálidas y moderadamente secas, y puede atacar a sus huéspedes en cualquier estadio de crecimiento.

U. maydis ha sido considerado modelo biológico desde mediados de la década de los 40's para el estudio de las interacciones planta-microbio (Kamper 2006), su especificidad en el apareamiento, buena recombinación genética, los genes que participan y controlan el proceso de dimorfismo, vías de señalización, entre otros (Ruiz-Herrera y Martínez 1998; Bölker 2001; Martínez-Espinoza et al. 2002; Klosterman 2007; Ruiz-Herrera et al. 2008; Brefort et al. 2009; Vollmeister et al. 2011; Ruiz-Herrera y León 2012; Valdés-Santiago et al. 2012; Ruiz-Herrera et al. 2013; León et al. 2014) y ha servido como base para describir funciones en otros hongos biotróficos complejos. Comparado con otros sistemas, *U. maydis* exhibe un número de propiedades genéticas que lo hacen un excelente candidato para elucidar mecanismos moleculares complejos (Bölker 2001). Dentro de las principales características que han hecho de este hongo un importante modelo de estudio por diferentes aspectos de la biología fúngica, se pueden citar los siguientes: 1) la existencia de una fase haploide durante la cual el hongo forma colonias de levaduras compactas, permitiendo el uso de técnicas bacteriológicas simples; 2) la posibilidad de construir diploides para el análisis de la complementación y dominancia; 3) su capacidad para ser transformado genéticamente; 4) la existencia de recombinación homóloga; 5) la existencia de diferentes marcadores de selección; 6) facilidad para llevar a cabo análisis de segregación; 7) La capacidad de completar su ciclo de vida en un tiempo corto en plantas de maíz jóvenes; 8) La posibilidad de obtener su transición dimórfica *in vitro* por diferentes procesos; 9) la existencia de hospederos

experimentales alternativos; 10) La posibilidad de obtener su ciclo sexual in vitro (Ruíz-Herrera 2008; León et al. 2014) Otra ventaja en el uso de *U. maydis* radica en que su genoma ha sido totalmente secuenciado, parcialmente anotado y se encuentra disponible libremente (Kämper et al. 2006; León et al. 2014). Por lo que se sabe que este hongo posee un genoma con 20.5 millones de bases, organizadas en 23 cromosomas, contiene 6,902 genes que codifican proteínas, y posee relativamente pocos intrones debido a una alta eficiencia en recombinación homóloga; dándole sentido a su genoma relativamente pequeño (Kämper et al. 2006; Klosterman 2007) (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>).

III.JUSTIFICACIÓN

El zinc es esencial para la viabilidad de todo organismo. El interés en este nutriente ha aumentado en la última década debido a su extensa deficiencia alrededor del mundo. Una de las principales razones de deficiencia de micronutrientes en cerca de 3 mil millones de humanos es la dieta basada en cereales con escaso contenido del mismo, lo que provoca alrededor de 450,000 muertes de niños cada año; esto debido a que la deficiencia del metal está extendida en terrenos agrícolas y la biodisponibilidad del zinc puede verse afectada por muchos factores.

Todos los suelos agrícolas en México son deficientes en zinc, aunque es más común en las regiones altamente erosionadas del norte del país. El maíz es el cultivo más grande en México y es el que tiene mayor probabilidad de ser cultivado en suelos deficientes en zinc (dando lugar a maíz con bajo contenido del metal). Las tortillas de maíz son la principal fuente de ingesta calórica para los mexicanos; por lo tanto, el maíz es el cultivo más consumido en México. Se estima que >20% de la población mexicana tiene deficiencia de zinc.

En el aspecto económico, por exponer un ejemplo; México es el segundo mayor productor de nueces en el mundo, y un factor limitante en la producción de nuez en esta región es la baja disponibilidad de zinc en los suelos alcalinos (calcáreos) lo que representa un desafío para los mexicanos en la implementación de fuentes de zinc biodisponible para las plantas y como consiguiente para los humanos.

Una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de zinc para las plantas es su asociación con micorrizas, las cuales incrementan la superficie de toma de nutrientes, ya que existen hongos basidiomicetos que forman asociaciones simbióticas con plantas, pero la mayoría de los mecanismos usados por estos hongos para obtener nutrientes no han sido descritos hasta el momento. *U. maydis* es un hongo basidiomiceto que causa el carbón común del maíz y es usado también como modelo de estudio.

Es imperativo conocer los mecanismos que utilizan los hongos basidiomicetos para lograr obtener zinc ante diferentes condiciones, para poder desarrollar estrategias que combatan la problemática deficiencia extendida del mismo.

IV. HIPÓTESIS

El transporte y homeostasis del zinc de *Ustilago maydis* se da a través de la membrana plasmática y del sistema vacuolar, mediado por proteínas transportadoras de zinc del tipo Zrt y Zap cuya función se encuentra influenciada por variaciones en las condiciones del medio ambiente, una de las más importantes el pH.

V. OBJETIVO DEL TRABAJO

- Caracterizar las funciones y localización de las proteínas codificadas por los genes homólogos a ZRT1, ZRT2 y ZRT3 de ascomicetos, en *Ustilago maydis* y sus promotores *in silico*. Comprobar la función de la proteína codificada por el probable ZRT3 de *U. maydis*, mediante complementación de una mutante del mismo en *Saccharomyces cerevisiae* y el desarrollo de una mutante.
- Determinar influencia de ZRT1, ZRT2 y ZRT3 en el crecimiento de *U. maydis* con respecto a las concentraciones de zinc y de otros metales, tras el diseño de medio bajo en zinc, para determinar su especificidad y variaciones en el pH del medio.
- Demostrar a través del análisis de expresión de ZRT1, ZRT2 y ZRT3 de *U. maydis*, si Rim101p interviene en su regulación.
- Desarrollo de Mutantes de los genes ZRT1, ZRT2, ZRT3 y ZAP de *U. maydis* y su caracterización.
- Fusión de los genes con proteínas reporteras a fin de ubicar su localización celular.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos y su conservación.

Las cepas empleadas a lo largo del estudio fueron almacenadas en una mezcla de glicerol y el medio específico, en una relación de 50% v/v en ultracongelación, a -80°C. Todos los microorganismos utilizados en el desarrollo de este estudio, se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos usados en el estudio.

Organismo	Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Ustilago maydis</i>	FB1	a1b1	Banuett and Herkowitz 1989
	BMA2	a2b2ΔRIM101::hyg	Aréchiga and Ruiz-Herrera 2005
	ΔUmZRT1 (28 y 49)	a1b1ΔZRT1::hyg	Martha-Paz et al. 2019
	ΔUmZRT2(6)	a1b1ΔZRT2::hyg	Martha-Paz et al. 2019
	ΔUmZAP (posibles)	a1b1ΔZAP::hyg	Martha-Paz et al. 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4743	MATα/a his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3met15/MET15 lys2/LYS2	Brachmann et al. 1998
	ZHY3	MATα ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3	Zhao y Eide 1996 ^a
	AMP96	MATα ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3/pDR195umZRT1	Martha-Paz et al. 2019
	RRM10	MATα ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3/pDR195umZRT2	Martha-Paz et al. 2019
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	F- Φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Carlsband, CA

6.2 Plásmidos

Los plásmidos empleados para este estudio, se presentan en la tabla 2, los mapas, así como sus secuencias se muestran en los datos suplementarios.

Tabla 2. Información de los plásmidos empleados en el desarrollo del proyecto.

Plásmido	Características	Referencia
pDR195	Marcadores de selección: amp y URA3. Promotor de alta eficiencia pPMA1	Rentsch et al. 1995
pDR195umZRT1	Contiene una copia del gen UmZRT1 de <i>U. maydis</i>	Martha-Paz et al. 2019
pDR195umZRT2	Presenta una copia del gen UmZRT2 de <i>U. maydis</i>	Martha-Paz et al. 2019
pMC5	Contiene una copia del gen ZRT1 de <i>S. cerevisiae</i> y los marcadores de selección amp y URA3 para <i>E. coli</i> y levaduras respectivamente	Zhao y Eide 1996 ^a
pHyg-101	Este plásmido es pBS-Ars102 con Hsp70-HygB insertado en BgIII. Contiene el gen de resistencia a amp e Hyg. Presenta la secuencia ars de <i>U. maydis</i> para su conservación	Mayorga and Gold 1998
PMF5-5c	Contiene en el C- terminal mCherry Myc (Fusión) y resistencia a carboxina	Petra Happel, Hassan Ghareeg (Group of Jan Schirawski)

6.3 Medios de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo fue utilizada agua bidestilada o agua ultra pura según los requerimientos. Dependiendo de la necesidad, se añadió ampicilina (100µg/ml de medio) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 10835242001), Kanamicina (50µg/ml de medio) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 10106801001) o Higromicina (Gold Biotechnology, San Luis, MO. No. Cat. H-270-5) en la concentración requerida. En caso del medio sólido se agregó el 2% de agar bacteriológico (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat 215000). Todo medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C, 15 lb de presión, durante 20 minutos o por filtración.

6.3.1 Elementos traza (Holliday 1961):

60 mg de H_3BO_3 (GE Healthcare. Chicago, IL. No. Cat. 17-1322-01), 140 mg de MnCl_2 (Jalmek, Nuevo Leon, México. No. Cat. 13446-34-9), 400 mg de ZnCl_2 (Jalmek, NL, México. No. Cat. 7646-85-7), 40 mg de $\text{Na}_2\text{MgMoO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ (CTR Scientific, NL, México. No. Cat. 03440), 100 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ (Merck, Darmstadt, Alemania. No. Cat. 10025-77-1) y 400 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$, se disolvieron en 1 L de agua bidestilada y la solución fue esterilizada bajo las condiciones antes mencionadas. De ser requerido algún medio controlado de zinc se omitió la adición del compuesto que contuviese dicho metal.

6.3.2 Solución de sales de *Ustilago maydis* (Holliday 1961):

16 g de KH_2PO_4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. No. Cat. 3252-01), 4 g de Na_2SO_4 (Bio Basic Inc. Markham, ON. No. Cat. 7757-82-6), 8 g de KCl (Jalmek, NL, México. No. Cat. 7447-40-7), 2 g de Mg SO_4 (Jalmek NL, México. No. Cat. 7487-88-9), 1 g de CaCl_2 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 10043-52-4), se adicionaron 8 ml de los elementos traza, se aforó a 1 L de agua bidestilada y se procedió a la esterilización en autoclave.

6.3.3 Medio completo (MC) (Holliday 1961):

2.5 g de peptona de caseína (MCD Lab, Estado de México, México. No. Cat. 9222), 10 g de extracto de levadura (MCD Lab, Estado de México, México. No. Cat. 9032), 1.5 g de NH_4NO_3 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 221244) y se adicionaron 62.5 ml de la solución de sales, se llevó a pH 7.0 y se aforó a 500 ml con agua bidestilada y por separado se pesaron 10 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800) y fueron llevados a un volumen de 500 ml, se procedió a la esterilización de ambas soluciones y después de dicho paso, se procedió a mezclarlas.

6.3.4 Medio DCM-S:

Por litro – 10 g de casaminoácidos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. No. Cat. 223050), 3 g de NH_4NO_3 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 221244), 20 g de extracto de levadura (MCD Lab. Estado de México, México. No. Cat. 9032), 125 ml de solución de sales de *Ustilago maydis*, 182.2 g D-Sorbitol (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 50-70-4), se llevó a pH 7.0 con NaOH (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 50-70-4S5881) y se agregaron 20 g de agar (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat 215000). Se esterilizó por autoclave y se agregó 1% de glucosa estéril (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800).

6.3.5 Medio Mínimo (MM) (Ruiz-Herrera et al. 1995):

Este medio fue preparado en pH 3.0, 7.0 y 9.0 según lo requerido, en el crecimiento de *U. maydis*. Para la preparación del MM pH 3.0 (MM3) se pesaron 3g de NH_4NO_3 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 221244) y para el MM pH 7.0 (MM7) se pesaron 3g de KNO_3 (Analytyka, Nuevo Leon, México. No. Cat. 77-57-79-1), se agregó H_3PO_4 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 695017) (por su capacidad amortiguadora) de manera que el medio resultante estuviera a una concentración de 100 mM del mismo, posteriormente se agregaron 62.5 ml de solución de sales (descritas en el apartado anterior), se llevó al pH deseado 3.0 o 7.0 con Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 3.5 M (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617) y se aforó a 500 ml con agua bidestilada. Por separado se pesaron 10 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800) y se aforó a 500 ml. Se procedió a esterilizar en autoclave y finalmente se mezclaron las 2 soluciones. Para la elaboración de MM pH 9.0 (MM9) Se pesaron 3 g de KNO_3 (Analytyka, Nuevo Leon, México. No. Cat. 77-57-79-1), se adicionaron 62.5 ml de solución de sales y se agregó TRIS 3.5 M (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617), de manera que se completará una concentración de 50 mM en el medio, se ajustó a pH 9.0 con H_3PO_4 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 695017) y se aforó a un volumen de 500 ml. Por separado se pesaron 10 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800) y se aforaron a 500 ml con agua bidestilada. Se procedió a su esterilización por autoclave y finalmente se mezclaron las soluciones.

6.3.6 Medio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose):

Para la preparación de 1 L de medio se pesaron 10 g de extracto de levadura (MCD Lab, Estado de México, México. No. Cat. 9032), 20 g de peptona (MCD Lab, Estado de México, México. No. Cat. 9222) y 20 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800), se mezclaron los componentes y se procedió a su esterilización por autoclave.

6.3.7 Medios para el control de la concentración de zinc

Este tipo de medios fue utilizado para el crecimiento tanto para cepas de *U. maydis* como de *S. cerevisiae*. Para la preparación de dichos medios, el material usado fue lavado con una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788) a una concentración de 3.5 mM durante 24 horas, con agitación constante en un agitador magnético con ayuda de una bala magnética, para eliminar cualquier traza de metales que pudiese existir (entre ellos el zinc), posteriormente se enjuagó con agua ultrapura. Para evitar cualquier contaminación de metales, todo tubo utilizado en el crecimiento de microorganismos en este tipo de medios, fue completamente nuevo y estéril. En todo caso se utilizó agua ultrapura para la elaboración de los medios y fueron esterilizados por filtración (Corning® bottle-top vacuum filters, membrana de acetato de celulosa, tamaño de poro 0.22 µm, diámetro de membrana 70 mm) (Corning Inc. Corning NY. No. Cat. 430015) o por autoclave separando la glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800).

6.3.7.1 Medio mínimo para levaduras (Yeast minimal media-SD/Synthetic Defined):

Para la preparación del medio SD se utilizaron 6.7 g de medio YNB (yeast nitrogen base) sin aminoácidos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. No. Cat. 291940) y 5 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800) para preparar 1 L de medio, en el caso de cepas auxótrofas, se agregó el aminoácido requerido. Por último, la mezcla fue esterilizada por filtración.

6.3.7.2 Medio bajo en zinc base (LZM/ Low zinc médium) (modificado de Zhao y Eide 1996a por MacDiarmid and Bucci Wisconsin Madison University):

6.3.7.2.1 Solución de sales principal 10X.

(NH₄)₂SO₄ 400 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 204501), CaCl₂ (2H₂O) 10 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. C3306), MgCl₂ (6H₂O) 50 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 7791-18-6), KH₂PO₄ 50 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 229806), se esterilizó en autoclave.

6.3.7.2.2 Elementos traza 10,000X:

H₃BO₃ 100 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 339067), CuSO₄ (5H₂O) 2 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 203165), KI 5 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 204102), Na₂MoO₄ (2H₂O) 10 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 480967). Se disolvieron los componentes en HCl 0.1 N (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 339253) (no fueron esterilizados).

6.3.7.2.3 Solución de vitaminas 1000X:

Biotina 0.2 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 58-85-5), pantotenato de calcio 40 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 137-08-6), ácido fólico 0.2 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 59-30-3), mioinositol 1000 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. I7508), niacina 40 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 59-67-6), ácido p-aminobenzoico 20 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 150-13-0), hidrocloreuro de piridoxina 40 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 47862), riboflavina 20 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. R9504), hidrocloreuro de tiamina 40 mg (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. T4625). Se aforó a 100 ml con agua ultrapura y se esterilizó por filtración.

Una vez realizadas las soluciones requeridas, para la preparación de 1 L de medio LZM, se utilizaron: 100 ml de la solución sales 10X, 1 ml de solución de

vitaminas 1000X, 100 µl de solución de metales 10,000X, además se agregaron: FeCl₃ (Merck, Darmstadt, Alemania. No. Cat. 10025-77-1) para alcanzar la concentración de 10 µM, MnSO₄ (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 229784) para 25 µM, 2 ml de EDTA 500 mM (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788) y 20 ml de citrato de sodio 1 M (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 18996-35-5). En caso de requerir aminoácidos para selección, solo se agregaron los que fuesen necesarios y no intervinieran en dicho proceso. Las cantidades de aminoácidos sugeridas son las siguientes (Para 1L de medio): uridina 0.1 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. U6381), adenina 0.1 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. A8626), histidina 0.1 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 71-00-1), leucina 0.11 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 61-90-5), triptófano 0.1 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 73-22-3), metionina 0.1 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 63-68-3), Lisina 0.12 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 56-87-1), fenilalanina 0.05 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. P2126), serina 0.4 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 84959), treonina 0.2 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 72-19-5), glutamato 0.1 g (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 142-47-2). Se agregaron en la misma solución 20 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800), y se esterilizó por filtración. Una vez realizado el LZM base, se adicionaban las concentraciones de zinc necesarias para el desarrollo de los experimentos.

6.3.7.3 Medio bajo en zinc modificado para expresión de los genes ZRT1 y ZRT2.

Para lograr que los genes probables ZRT1 y ZRT2 se expresaran en *Ustilago maydis* fueron imitadas las condiciones en las cuales dichos genes son expresados en *Saccharomyces cerevisiae*, además fue de especial interés determinar si dichos genes son regulados por el factor de transcripción pacC/Rim101 ante variaciones de pH.

Para cumplir con los principales objetivos del presente estudio, mediante el uso del programa MAXCHELATOR software (Patton 1994. <http://maxchelator.stanford.edu/>), fueron diseñados 2 tipos de medios, correspondientes a pH 4.0 y 7.0. Se utilizó el protocolo del LZM (cuyo pH es de 4.2) como base, y se realizaron modificaciones en cuanto a los agentes quelantes, debido

a que los mismos muestran su actividad óptima en diferente pH y era crítico mantener las mismas condiciones de zinc libre en el medio (1×10^{-12} M de Zn^{+2}) independientemente del pH.

La preparación de los 2 medios se llevó a cabo tal como se describió anteriormente para el LZM base, solo varían los agentes quelantes y se ajustó cada uno al pH requerido, antes de su esterilización por filtración. Para el medio bajo en zinc a pH 4.0 (LZM4) se utilizó como quelante, al igual que en el LZM base, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una concentración final de 1 mM, adicionándose $ZnCl_2$ (Jalmek, NL, México. No. Cat. 7646-85-7) hasta alcanzar 0.17 μ M. En el caso de LZM pH 7.0 (LZM7) se utilizó como agente quelante el ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), logrando en solución una concentración de 10 mM y se añadió $ZnCl_2$ hasta llegar a 3 μ M.

6.3.8 Medio Luria-Bertani (Sambrook et al. 1982):

10 g de peptona de caseína (MCD Lab, Estado de México, Mexico. No. Cat. 9222), 5 g de extracto de levadura (MCD Lab, Estado de México, Mexico. No. Cat. 9032), 10 g de cloruro de sodio (NaCl) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 746398), se ajustó a pH 7.0, se aforó a 1L y se procedió a su esterilización por autoclave.

6.3.9 Medio SOC (Super optimal broth with catabolite repression) (Hanahan 1983):

Fue utilizado para el crecimiento de *E. coli* durante los procedimientos de transformación; 20 g de tripona (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 91079-40-2), 5 g de extracto de levadura (MCD Lab, Estado de México, México. No. Cat. 9032), 3.6 g de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800), 0.186 g de KCl (Jalmek, NL, México. No. Cat. 7447-40-7), 0.5 g de NaCl (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 746398). 0.96 g de $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 7791-18-6) y por último fue esterilizado por autoclave bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

6.4 Pretratamiento y cultivo de los organismos

6.4.1 Estrés nutritivo:

Para llevar a cabo la disminución de reservas existentes en las cepas de *U. maydis* fue llevado a cabo el siguiente protocolo; se utilizó agua ultrapura estéril en todos los pasos y se activó a partir de glicerinado en medio YPD, se incubaron en agitación durante 24 horas a 28°C, se colectó el concentrado celular centrifugando a 3500 rpm, después se lavaron 2 veces con agua. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de agua e incubadas por 15 horas a 28°C en agitación, después se lavaron dos veces con agua antes de su inoculación.

6.4.2 Ensayos de inoculación por gota:

Para caracterizar cualitativamente la capacidad de transporte de zinc, se realizó el ensayo de gota celular en placas de YNB con 0, 1, 10, 100 y 1000 μM de ZnCl_2 (Jalmek, NL, México. No. Cat. 7646-85-7). Las células inoculadas fueron sometidas al mismo estrés nutritivo que las analizadas por ICP-OES y también se comenzó en una $\text{DO}_{600}=0.5$ y se inocularon diluciones seriadas.

6.5 Protocolos de manipulación de ácidos nucleicos:

6.5.1 Soluciones y reactivos

6.5.1.1 Sodio-Tris-EDTA-SDS (NTES) (Sambrook y Rusell 2001):

Concentraciones finales en solución: 10 mM de NaCl (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 746398), 10 mM de Tris-Cl (pH 7.5) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617), 1 mM de EDTA (pH 7.5) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788) y 1% de SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA. No. Cat. 15525-017). La mezcla fue esterilizada por autoclave.

6.5.1.2 Tris-EDTA (TE) (Sambrook y Rusell 2001):

Tris-Cl (pH 8.0) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617) en una concentración final de 100 mM y 10 mM de EDTA (pH 8.0) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788). Esterilizados por autoclave.

6.5.1.3 Tris-Ácido bórico-EDTA (TBE) 5X (Sambrook y Rusell 2001):

54 g de Tris base (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617) y 27.5 g de H₃BO₃ (GE Healthcare. Chicago, IL. No. Cat. 17-1322-01), se disolvieron en 900 ml de agua bidestilada y se agregaron 20 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788), finalmente se aforó a 1 L (no se esterilizó).

6.5.1.4 Buffer de carga 6X:

0.25% (P/V) (25 mg) de azul de bromofenol (Merck, Darmstadt, Alemania. No. Cat. 115-39-9) y 40% (4 g) de sucrosa (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. S8501) en 10 ml de agua bidestilada, (no se esterilizó).

6.5.1.5 Ácido Morfolino Propano Sulfónico (MOPS) 10X (Sambrook y Rusell 2001):

0.2 M ácido morfolinopropanelsulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. M1254), 10 mM EDTA pH 8.0 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788), 20 mM de CH₃COONa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. S2889), se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 3.5 M (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 50-70-4S5881), se disolvieron los componentes con agua estéril tratada con agua de DEPC (Ver en apartado de soluciones) y se ajustó el pH con NaOH. No se esterilizó en autoclave ya que es un compuesto irritante y no lo requiere y se uso mascarilla durante su manipulación.

6.5.1.6 Solución I:

25 mM de tris-Cl pH 8.0 (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617), 10 mM de EDTA pH 8.0 (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788), 50 mM de glucosa (BD Bioxon, Oaxaca, México. No. Cat. 216800). Se esterilizó por autoclave bajo las condiciones antes mencionadas.

6.5.1.7 Solución II:

NaOH 0.2 M (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 50-70-4S5881) y 1% de SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA. No. Cat. 15525-017), disueltos en agua bidestilada estéril. No se esterilizó.

6.5.1.8 Solución III:

Se agregaron 3M de KCH_3CO_2 (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. P1190) y se procedió al ajuste de pH con ácido acético (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 64-19-7) hasta 5.5. Se esterilizó por autoclave.

6.5.1.9 Fenol cloroformo alcohol isoamílico (Sambrook y Rusell 2001):

Proporción 25:24:1 vol/vol/vol respectivamente.

6.5.1.10 Agua libre de nucleasas (Sambrook y Rusell 2001):

Fue obtenida tras un tratamiento con el reactivo dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. D5758); se añadió 1 ml de DEPC por cada litro de agua bidestilada (en condiciones de obscuridad), se agitó vigorosamente e incubó a 37 °C por 24 horas. Se esterilizó en autoclave.

6.5.1.11 Acetato de litio (1X) (Gietz et al. 1995):

Se disolvieron 5.1 g de acetato de litio dihidratado (CH_3COOLi) $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. L6883) en 50 ml de agua y se esterilizó por autoclave; la solución fue almacenada a temperatura ambiente.

6.5.1.12 Solución de PEG 3350 (1X) (Gietz et al. 1995):

Se disolvieron 50 g de PEG 3350 (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 25322-68-3), en 30 ml de agua ultrapura mediante la aplicación de calor. Cuando la solución se enfrió a temperatura ambiente, se aforó a 100 ml, se mezcló por inversión y finalmente se esterilizó en autoclave. Fue conservada a temperatura ambiente.

6.5.1.13 Solución acarreadora de DNA de cadena sencilla (ssDNA) (2.0 mg/ml) (Gietz et al. 1995):

Se disolvieron 200 mg de DNA de esperma de salmón (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. D1626) en 100 ml de buffer TE pH 8.0, se mezcló durante 1-2 horas a una temperatura de 4°C. Se realizaron alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20°C.

Nota: El acarreador de DNA fue desnaturalizado al hervirlo en baño maría por 5 minutos y enfriado inmediatamente en hielo antes de usarse.

6.5.1.14 40% PEG en STC:

Se mezclaron 4g de polietilenglicol (PM 3350) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 25322-68-3) y 1.82 g de sorbitol (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 50-70-4) con 3 ml de agua destilada, con 0.1 ml de Tris-HCl (1M pH 7.5) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617), 1 ml de CaCl_2 (1M) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 10043-52-4) y se aforó con agua destilada hasta 10 ml, finalmente se esterilizó en autoclave.

6.5.2 Protocolos generales de extracción y tratamiento de ácidos nucleicos

6.5.2.1 Extracción de ADN genómico (Sambrook y Rusell 2001):

En el caso de cepas de *U. maydis* después de ser activadas, fueron inoculadas en MC durante 24 h a 28 °C. Las cepas de *S. cerevisiae* fueron crecidas en medio YPD durante 15 h a 30 °C;

- se tomaron 3 ml de medio de cultivo con células en crecimiento y se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 min a 4 °C (la centrifuga Eppendorf Microcentrifuge 5415R, fue utilizada durante todo el procedimiento) y posteriormente se decantó el sobrenadante;
- fueron agregados 500 µl de Buffer NTES y se resuspendió la pastilla celular;
- posteriormente se incubó en hielo durante 20 min, enseguida fueron agregados 0.3 g de perlas de vidrio estériles (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. G9018) y se mezcló en vortex durante 10 min;
- se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante;
- fueron agregados 400µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se mezcló en vortex por 1 min;
- posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min y se recuperó la fase superior;
- se agregaron 0.1 volumen de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 7.5 M (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. A1542) y 2 volúmenes de etanol al 96% o isopropanol al 100%, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por mínimo durante 12 h;
- luego se centrifugó a 13,500 rpm durante 20 min;
- se retiró el sobrenadante y se procedió al lavado de la pastilla, agregando 500µl de etanol al 70%;
- se mezcló en vortex durante 2 min y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min, se retiró sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante a 65°C en el Thermomixer® durante 10 min, y
- finalmente, se resuspendió la pastilla en 30 µl de buffer TE.

Nota. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos a 80 Voltz (240 Amperes).

6.5.2.2 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Miniprep) (Birnboim y Doly 1979):

- se cultivó una colonia seleccionada en 5 ml de medio LB y al cual se le agregó previamente el antibiótico usado como marcador de selección, durante 16 h;
- se centrifugaron los 5 ml del medio a 13,500 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante;
- Re suspensión del concentrado celular en 150 µl de la solución 1 (ver sección de soluciones), se incubó a temperatura ambiente durante 5 min;
- fueron adicionados 200 µl de la solución 2 y se mezcló suavemente por inversión durante 5 min y se procedió a incubar en hielo durante 15 min;
- se agregaron 150 µl de la solución 3 y se mezcló gentilmente durante 3 min y se procedió a incubar en hielo durante 15 min;
- posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante;
- se agregaron 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se mezcló en vórtex durante 1 min;
- se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min y se recuperó la fase superior;
- luego se adicionaron 2 volúmenes de isopropanol previamente enfriado a -20 °C y se mezcló por inversión;
- posteriormente se incubó a -20 °C durante 12 horas y se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante;
- se agregaron 500 µl de etanol al 70% frío y se mezcló en vórtex durante 1 min y se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min;

- se realizó un paso de lavado del DNA con etanol y se colocó el tubo en el Thermomixer® a una temperatura de 65 °C, para evaporar el etanol restante durante 10 min, y
- posteriormente se resuspendió el concentrado celular en 30µl de buffer TE.

Nota. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1%, durante 40 min a 80 voltz (240 Amperes).

6.5.2.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa (Modificado de QIAquick® Spin Handbook):

Para la elaboración de casetes de reemplazo fue requerida la purificación de los amplificadores de DNA obtenidos por PCR y se llevó a cabo mediante modificaciones del protocolo correspondiente al kit de extracción QIAquick, tal como se muestra a continuación:

- se procedió a cortar la banda del gel después de haberlo corrido en buffer TBE, la banda fue transferida a un tubo de microcentrífuga previamente pesado;
- fueron agregados 3 volúmenes de buffer QG (QIAGEN, Hilden, Alemania. No. Catálogo 19063) con respecto al peso de la banda y se incubó a 50 °C hasta lograr que se disolviera;
- se colocó la solución en columna sobrepuesta en tubo de microcentrífuga y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm;
- posteriormente se descartó el líquido y se colocó la columna en tubo colector, fueron agregados 200 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm;
- se decantó el etanol y se centrifugó la columna aun en el mismo tubo, durante 3 minutos a 13,000 rpm;

- se agregaron 30 µl de buffer TE pre calentado a 95 °C y se procedió a centrifugar a las mismas rpm antes mencionadas durante 5 min, y
- por último, como control de calidad, se corrió un gel de agarosa para comprobar la pureza de las bandas.

6.5.2.4 Extracción de ARN (Sambrook y Russell 2001):

Las cepas FB1 (WT) de *Ustilago maydis* (Banuett y Herkowitz 1989) y BMA2 (RIM101⁻) (Aréchiga y Ruiz-Herrera 2005) fueron cultivadas en medio SD durante 12 horas a 28°C, las células se sometieron a estrés nutritivo tal como se describió anteriormente y fueron inoculadas (comenzando en DO₆₀₀=0.01) en medios LZM modificados para la exposición de las células a la misma concentración de zinc libre en los pH probados, posteriormente se procedió a la extracción de RNA, tal como se muestra a continuación:

Nota: Durante toda la técnica las muestras fueron conservadas en hielo.

- fue recolectado lo correspondiente a 2 g de pastilla celular de las levaduras, se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante;
- los morteros a utilizar fueron enfriados con nitrógeno líquido, posteriormente se sumergió el tubo con las células en el nitrógeno durante 10 s, para congelarlas, después con ayuda de una espátula estéril dicha pastilla congelada fue vertida en el mortero y se procedió al rompimiento de la pared celular, hasta obtener un polvo blanco, que fue inmediatamente colocado en un tubo de microcentrífuga;
- se agregaron 500 µl de buffer NTES, 500 µl fenol cloroformo alcohol isoamílico, se resuspendió el concentrado celular y se mezcló durante 10 min en el agitador tipo vórtex, intercalando con periodos de 1 min en hielo y se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm;

- fue transferida la capa superior a un tubo nuevo y se agregaron 400 μ l de fenol cloroformo alcohol isoamílico y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min;
- se transfirió el sobrenadante a tubos de microcentrífuga nuevos y se agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto;
- posteriormente se incubó a -20 °C durante 20 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante;
- se resuspendió la pastilla en 500 μ l de agua tratada con DEPC;
- luego se agregó etanol al 96%, en un volumen correspondiente al 10% del total existente en el tubo;
- se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo;
- fueron agregados 500 μ l de acetato de litio 4M y se incubó a -20 °C, mínimo por 3 horas o durante la noche;
- se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante;
- posteriormente se disolvió la pastilla en 400 μ l de agua previamente tratada con DEPC;
- se agregaron 40 μ l de acetato de sodio 3M y 900 μ l de etanol absoluto y se incubó a -20 °C durante 2 h;
- se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min y se disolvió la pastilla en 300 μ l de agua tratada con DEPC, y
- por último se almacenó a -80°C.

6.5.2.5 Digestión de la muestra de ARN (Sambrook y Russell 2001):

- se realizó una mezcla de digestión, a la cual se le adicionaron 10 µl de formamida desionizada (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. F9037), 2 µl de MOPS 10X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. No. Cat. 4004-01), 4 µl de formaldehído (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. F8775), y 2 µl de ARN;
- posteriormente se incubó 10 min a 35°C y se colocó en hielo durante 10 min;
- fueron agregados 5 µl de buffer de carga 6X, y
- se agregó 1 µl de bromuro de etidio (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. E1510) estéril 1X y se corrió la muestra en buffer MOPS 1X a 70 voltz, durante 1 h y media.

6.5.2.6 Gel de electroforesis para ARN (Sambrook y Russell 2001):

NOTA: Un día previo a realizar el protocolo se colocó la cámara de electroforesis completa a desinfectar con solución de cloro al 10% y al día siguiente se enjuagó con agua tratada con DEPC.

- Se añadió 1.5% de agarosa a 72 ml de agua estéril y se disolvió;
- posteriormente se enfrió la solución hasta 55 °C;
- se añadieron 10 ml de buffer de corrida MOPS 10X;
- fueron agregados 18 ml de formaldehido y se mezcló;
- se vertió en molde y se dejó solidificar por lo menos durante 1 h a temperatura ambiente, y
- previo a cargar la muestra se corrió el gel vacío durante 5 minutos, con buffer TBE.

6.5.2.7 Tratamiento de ARN con DNasa

Antes de utilizar cualquier muestra de ARN, se procedió a eliminar el posible ADN contaminante que pudiese existir tras la extracción del mismo, mediante un tratamiento con DNasa, siguiendo las especificaciones del proveedor (Promega, Madison, WI. No. Cat. M6101), implementando la mezcla de los siguientes componentes: ARN (1-8 μ l), buffer RQ1 RNasa-DNasa 10X (1 μ l), enzima RQ1 RNasa-DNasa (1U/ μ g RNA) y agua tratada con DEPC (hasta completar 10 μ l). Una vez adicionados los componentes a la reacción, esta fue incubada a 37 °C durante 30 min, finalmente se agregó 1 μ l de la solución inactivadora de la RQ1 DNasa y se incubó a 65 °C por 10 min.

6.5.2.8 Desarrollo de qRT-PCR

6.5.2.8.1 Síntesis de ADNc a través de retro-transcripción (RT-PCR)

Omniscript® Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Hilden, Germany. No. Cat. 205111):

- se preparó la mezcla de reacción en el siguiente orden: 12 μ l de agua, 2 μ l de buffer (concentración final: 1X), 1 μ l de hexámeros (QIAGEN, Hilden, Germany. No. Cat. 79236) (concentración final: 1 μ M), 2 μ l de dNTP's (concentración final: 0.5 mM cada dNTP), 1 μ l de RNA (50 ng previamente tratados con DNasa);
- Se incubó la reacción que se llevó a cabo a 65 °C por 5 min;
- se añadió a la mezcla en el siguiente orden: 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa y 1 μ l de inhibidor de RNasa (QIAGEN, Hilden, Germany. No. Cat. 129916);
- la solución fue incubada a 25 °C durante 10 min, posteriormente a 37 °C por 60 min y finalmente a 70°C por 15 min, y
- las muestras fueron preservadas a -20°C.

6.5.2.8.2 Cuantificación relativa de la expresión genética por qPCR

6.5.2.8.2.1 qPCR para determinar la influencia de Rim101p en la expresión de transportadores de zinc.

Para la síntesis de ADNc se usaron hexámeros (QIAGEN, Hilden, Alemania. No. Cat. 79236). El ensayo de PCR cuantitativa fue implementado para analizar la expresión de los genes de actina, UmZRT1, UmZRT2, NRG1 y RIM101 de las cepas FB1 y BMA2 en dos experimentos biológicos y triplicados técnicos de cada gen, usando SsoAdvanced™ *Universal SYBR® Green Supermix* (BIO-RAD, Hercules, CA. No. Cat. 1725270) en un equipo de PCR tiempo real *CFX96 Touch™* (BIO-RAD, Hercules, CA). Los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla S3 y todas las reacciones de qPCR se realizaron según los protocolos de los fabricantes de los reactivos mencionados anteriormente. La cuantificación de la expresión génica relativa se llevó a cabo mediante el uso del método Livak (Livak y Schmittgen 2001) usando los niveles de expresión de cepa silvestre FB1 como calibrador y el valor de expresión del gen de actina como gene de referencia para la normalización. Las reacciones se realizaron como se describe en los siguientes pasos:

- se descongelaron los reactivos a temperatura ambiente, fueron mezclados y centrifugados para coleccionar las soluciones en el fondo de los tubos, después se almacenaron en hielo, protegiéndolos de la luz;
- las reacciones de 10 µl fueron preparadas en hielo, mezclando los siguientes reactivos: 5 µl de SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix (2x), 0.25 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 50 ng de ADNc, agua libre de nucleasas hasta completar 10 µl;
- se mezclaron las reacciones y se transfirieron a las placas (BIO-RAD, Hercules, CA. No. Cat. HSP9601), posteriormente se cubrieron con una película ópticamente transparente (BIO-RAD, Hercules, CA. No. Cat. MSB1001), y
- el programa utilizado fue el siguiente: 95°C-30 seg/ 95°C 30 seg/ 54°C 30 seg/ 40 ciclos/ Melt curve 65-95°C con incremento de 0.5°C, 2-5 seg/paso.

6.5.2.8.2.2 qPCR para identificar regulación de la expresión mediada por Rim101p en pH ácido.

Se implementó el ensayo de qPCR cuantitativo para analizar la expresión de las subunidades ribosomales 40s y 60s de los genes enlistados en la tabla S4 de las cepas FB2 y BMA2 crecidas en medio mínimo pH3 durante 14 horas a 28°C. Se realizaron ensayos con duplicado biológico y triplicado técnico para cada gen, usando SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA) en el equipo CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BIO-RAD, Hercules, CA). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla S4 y todas las reacciones fueron llevadas a cabo y procesadas como se describió en la sección anterior. La cuantificación de la expresión genética relativa se determinó con el método Livak (Livak and Schmittgen 2001) usando FB2 como calibrador y las subunidades ribosomales 40s y 60s como genes de referencia para la normalización.

6.5.2.9 Ensayos de complementación en *S. cerevisiae* con genes de *Ustilago maydis* (Recapitulación de tesis de maestría)

En el presente apartado se describen de manera resumida los protocolos realizados durante mi trabajo de maestría para el desarrollo de la complementación de *S. cerevisiae* con los genes UmZRT1 y UmZRT2 de *Ustilago maydis*, ya que en este estudio doctoral se le da continuidad a los resultados obtenidos previamente. Para un mayor detalle revisar la tesis de maestría titulada “Respuesta a estrés iónico/pH alcalino en *Ustilago maydis*”.

6.5.2.9.1 Amplificación de los genes UmZRT1 y UmZRT2:

Para la amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR fueron utilizadas diferentes enzimas, por lo que las reacciones se llevaron a cabo dependiendo del tipo de las mismas, y en todos los casos se agregaron controles negativos, realizando las reacciones bajo las mismas condiciones, pero sin la adición de ADN.

Para la elaboración de las construcciones de expresión fue utilizada la enzima de alta fidelidad para la clonación por PCR Easy-A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA. No. Cat. 600400), la mezcla realizada para la amplificación de los genes

se describe en la tabla 3 y las condiciones para la amplificación se describen en la tabla 4.

Tabla 3. Componentes de reacción de PCR llevada a cabo con enzima Easy-A. El programa utilizado para la enzima Easy A fue el descrito en la tabla 4 y la T_m fue seleccionada dependiendo del oligonucleótido empleado.

Componente	Cantidad por reacción
Agua mili-Q estéril	41.1 µl
Buffer de reacción Easy-A 10X	5.0 µl
dNTPs (25 mM cada dNTP)	0.4 µl
DNA molde (100ng/µl)	1.0 µl
Oligonucleótido 5' (100ng/µl)	1.0 µl
Oligonucleótido 3' (100ng/µl)	1.0 µl
Enzima Easy-A (5U/µl)	0.5 µl (2.5 U)
Reacción total	50 µl

Tabla 4. Programa de PCR implementado tras el uso de enzima Easy-A.

Segmento	Numero de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	95°C	2 minutos
2	34	95°C	40 segundos
		Oligo T _m	30 segundos
		72°C	2 minutos
3	1	72°C	7 minutos

6.5.2.9.2 Elaboración de vectores de expresión

El desarrollo de las construcciones para la expresión de genes del hongo *Ustilago maydis* en la cepa mutante de *S. cerevisiae* ZHY3, fue llevada a cabo tras amplificar los genes de interés utilizando oligonucleótidos diseñados con fragmentos de recombinación y con el protocolo de transformación de levaduras mediante acetato de litio, tal como se describe a continuación, con el uso de la cepa de *S. cerevisiae* BY4743 y el plásmido pDR195 que contiene regiones de recombinación, la cual es llevada dentro de la levadura integrando el gen de interés en el vector.

6.5.2.9.3 Transformación de levaduras con acetato de litio (modificado de Gietz et al. 1995):

- Las levaduras fueron inoculadas en 5 ml de medio YPD durante la noche hasta una $DO_{600}=1.0$ a 600 nm;
- Crecieron en 0.5 ml del cultivo en 9.5 ml de YPD;
- incubadas a 30 °C en agitación por un tiempo de 4 a 4.5 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 4.0 a 600 nm, se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento;
- las células fueron centrifugadas por 5 min a 3000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y fueron resuspendidas las células en 5 ml de acetato de litio 1X;
- las células se concentraron por centrifugación bajo las condiciones ya mencionadas y se descartó el sobrenadante; las células se resuspendieron en 0.5 ml de acetato de litio 1X.

NOTA: en la construcción de plásmidos mediante recombinación homóloga, se usó de 200-500 ng del vector linealizado más 500 ng/ μ g del inserto de PCR.

- Se desnaturalizó por calentamiento a 100°C el ADNss (solución stock 10mg/ml) por 1 minuto y se pasó a hielo para evitar la reasociación;
- fueron mezclados en un tubo de microcentrífuga: 10 μ l del ADNss, 50 μ l de las células resuspendidas, el plásmido linealizado y el producto de PCR;
- se agregaron 0.5 ml de una solución de PEG 3350 (40%) - acetato de litio 1X y se colocó en un agitador tipo vórtex inmediatamente;
- se incubó la transformación a 30°C por 45 min, y se dio un choque térmico a 42 °C por 15 min, después se llevó a la transformación a temperatura ambiente, y
- se concentraron las células mediante centrifugación durante 1 min a 3000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en líquido residual. Fueron sembradas todas las células en placas elaboradas con el respectivo marcador de selección.

6.5.2.9.4 Preparación de células calcio-competentes (Sambrook y Russel 2001):

- la cepa a tratar se cultivó en una placa de medio LB, a 37°C durante 16 horas;
- se realizaron subcultivos a partir de una sola colonia en 5 ml de medio LB líquido bajo las condiciones ya mencionadas, pero en agitación;
- se inocularon 1.5 ml del preinóculo en 250 ml de medio LB líquido, fue incubado a 37 °C en agitación y se midió la densidad óptica a 600 nm hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.35-0.4$;
- el crecimiento de las células se detuvo colocando el matraz en hielo por 20 min y se procedió a concentrar las células por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante;
- el concentrado celular se resuspendió en 25 ml de una solución fría de $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 7791-18-6) a 100 mM, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante;
- las células se resuspendieron en 50 ml de $CaCl_2$ (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 10043-52-4) frío a una concentración de 100 mM, fue incubado en hielo mínimo por 20 min, centrifugado a 3000 rpm durante 15 min a 4°C descartando el sobrenadante, y
- el concentrado celular se resuspendió en 1 ml de una solución de $CaCl_2$ 85 mM con 15% de glicerol fría y se realizaron alícuotas de 50 μ l y almacenadas en ultracongelación a -80 °C.

6.5.2.9.5 Transformación bacteriana (Invitrogen TM: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/subcloningefficiencydh5alpha_man.pdf):

- las células de *E. coli* DH5 α químico competentes previamente procesadas para fueron descongeladas en hielo;
- se agregaron 10pg-100ng del plásmido en el vial de las células;
- se mezcló gentilmente e incubó en hielo por 30 min;
- se realizó un choque térmico a 42°C durante 30 a 45 s y se colocó de inmediato en hielo por un periodo de 2-5 min;
- se promovió la recuperación de las células en 250 μ l de medio SOC o LB previamente precalentado y se incubó a 37°C en agitación a 225 rpm, y
- por último se sembraron de 25 a 100 μ l en placas de medio LB con el antibiótico de selección y se incubó durante 16 h a 37°C.

6.5.2.10 Generación de mutantes de *Ustilago maydis*

6.5.2.10.1 Construcción de casetes de reemplazo de los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP

Las mutantes de los genes ZRT1 y ZRT2 en *Ustilago maydis* (FB1) fueron obtenidas usando la técnica denominada división del marcador (split marker) (Fairhead et al. 1996, 1998; Catlett et al. 2003). La generación de los casetes de reemplazo génico se obtuvieron tal como lo describe (Yu et al. 2004). Como se muestra en la figura 1, usando los oligonucleótidos enlistados en la tabla S2, los casetes fueron contruidos por recombinación homóloga de la región río arriba y río debajo del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) del gen de interés y el gen marcador de selección higromicina B fosfotransferasa (hph), dichos fragmentos fueron amplificados utilizando la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA. No. Cat. 11304011) (Fig. 5 y 6).

Para obtener los casetes de reemplazo se realizó la fusión de los fragmentos: promotor (P) (100ng), terminador (T) (100ng) e higromicina (Hyg) (30ng),

utilizando la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, tal como se describe en tabla 5, sólo modificando el volumen correspondiente a los fragmentos y el contenido de agua. Posteriormente se realizó la fusión mediante PCR, utilizando el programa que se describe en la tabla 7.

Posteriormente se utilizó el casete como plantilla para amplificar 2 fragmentos: del inicio de la región 5' a la mitad del marcador de selección y por otra parte se amplificó de la mitad del marcador de selección al final de la región 3' (según parámetros mostrados en tabla 5 y 6). Se procedió a transformar con ambos fragmentos los protoplastos de *Ustilago maydis* para obtener una triple recombinación y menos falsos positivos durante la selección de transformantes (Fig. 2). Finalmente la mutación fue confirmada por PCR, restricción enzimática y secuenciación.

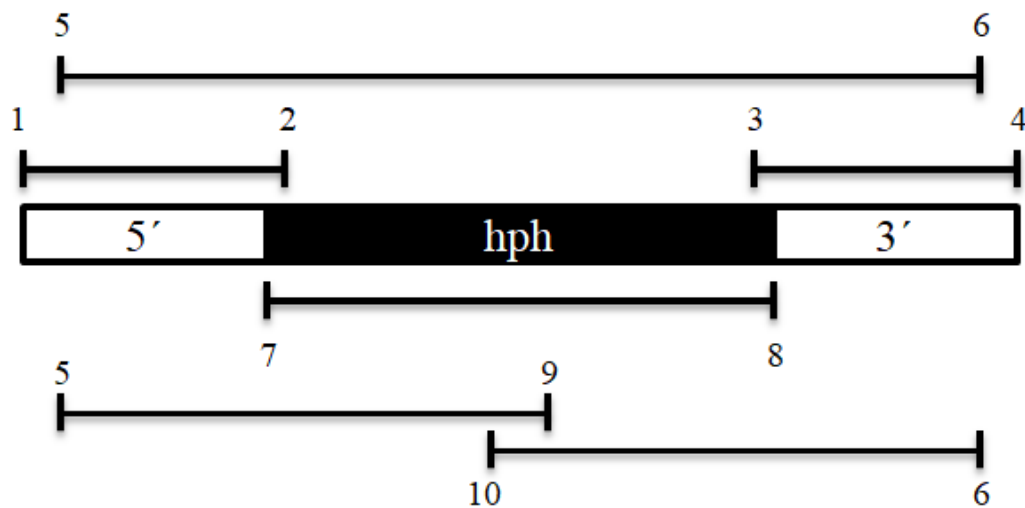


Figura 1. Desarrollo de casetes de reemplazo mediante la técnica de doble unión. La construcción está compuesta por regiones 5' y 3' localizadas aproximadamente 1000 pb río arriba y abajo respectivamente del marco de lectura abierto del gen de interés y del gen hph (fosfotransferasa de higromicina) como gen de resistencia. Los números representan los oligonucleótidos usados para amplificar las regiones delimitadas y que son descritos en la tabla S2.

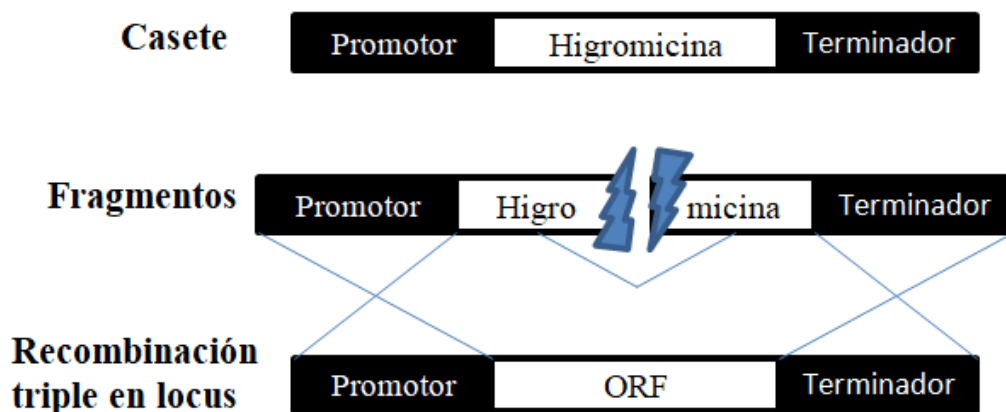


Figura 2. Representación gráfica del proceso de mutación mediante la técnica Split marker. La construcción fue amplificada en dos partes denominadas 5' y 3' que correspondían a la región P-Hyg y a Hyg-T respectivamente.

6.5.2.10.1.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para desarrollo de mutantes.

Tabla 5. Reacciones realizadas para la amplificación por PCR con la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/0948_PlatinumTaqDNA_Polymerase_High_Fidelity.pdf)

Componente	Reacción (µl)	Concentración final
Agua destilada estéril	7.05	-
Buffer High Fidelity 10X	1	1X
50 mM MgSO ₄	0.5	2.5 mM
Mix de dNTP 10 mM	0.25	0.2 mM cada uno
Oligonucleótido sentido (10 µM)	0.25	0.25 µM
Oligonucleótido antisentido (10 µM)	0.25	0.25 µM
ADN molde	0.3	<500ng
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (.5 U/µl)	0.4	0.2 U

Tabla 6. Programa general para la amplificación por PCR

Segmento	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración
1	1	95	2 min
2	45	95	40 s
		54	30 s
		72	1 min/Kb
3	1	72	7 min

Tabla 7. Parámetros usados para la fusión de fragmentos por PCR.

Segmento	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración
1	1	95	2 min
2	15	95	30 s
		54	10 min
		72	5 min
3	1	72	10 min

6.5.2.10.2 Formación de protoplastos (Tsukuda et al. 1988. Mol Cell Biol 8:3703-3709, modificado por K. Snyder).

- la preparación del preinóculo de la cepa FB1 en 5 ml de medio completo;
- posteriormente se inoculó en 50 ml de MC y se incubaron las células en agitación a 28°C hasta alcanzar una $DO_{600}=0.6 - 0.8$;
- se concentraron las células por centrifugación a 3500 rpm por 10 min, se decantó sobrenadante y se resuspendió en 20 ml de SCS.
- se concentraron nuevamente a 2500 rpm durante 10 min y se agregaron 50 mg de enzimas líticas (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. L1412);

- se incubó la reacción de formación de protoplastos mezclando por inversión a 28°C, observando su formación en el microscopio con un aumento de 40X, hasta completar el 80% de células de protoplastos;
- una vez formados el 60% de los protoplastos se concentraron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante con micropipeta y los protoplastos se resuspendieron con puntilla en 1 ml de SCS, posteriormente se transfirió la suspensión a un microtubo; con el fin de eliminar las enzimas.
- se concentraron nuevamente las células a 2000 rpm durante 10 min y se retiró sobrenadante con micropipeta cuidadosamente para no maltratar a los protoplastos, y
- finalmente, los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de STC frío y se procedió a realizar alícuotas para su transformación inmediata.

6.5.2.10.3 Transformación de protoplastos de *Ustilago maydis*:

- se mezclaron 5 µl de DNA transformante (1 µg de DNA aforado a 5 µl en STC) con 1 µl de heparina (bioWORLD, Dublin, OH. No. Cat. 40800004-1) (15 mg/ml en STC, almacenada a 4°C) y se mantuvo en hielo;
- se agregaron 50 µl de protoplastos, se mezcló gentilmente con pipeta y se incubó en hielo por 10 minutos;
- se agregaron 500 µl de PEG 40% frío, se mezcló levemente y se incubó en hielo por 15 minutos;
- se agregaron 500 µl de STC y se mezcló por inversión durante 1 minuto, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min en microcentrífuga;
- usando nueva puntilla para cada muestra, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de STC;
- se esparcieron las células en placas DCM-S con 500 mg/ml de higromicina;

- se incubaron a 28°C por un periodo de 4-5 días, y
- las colonias se transfirieron a placas de MC con 500 µg/ml de higromicina y posteriormente se realizó su caracterización molecular.

6.6 Cuantificación de composición elemental por ICP-OES (Modificado de Mendoza-Cózatl et al. 2014)

Los tratamientos utilizados fueron YNB con 0, 1, 10, 100 y 1000 µM de ZnCl₂. Se llevaron a cabo 3 diferentes experimentos biológicos, comenzando con una inoculación celular de DO₆₀₀=0.5 y se incubaron por 15 horas a 28°C, subsecuentemente se realizaron 3 lavados con EDTA 5Mm (Sigma-Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 431788) –Tris 25 mM (pH=8) (Sigma- Aldrich, San Luis, MO. No. Cat. 155617) y tres veces con agua desionizada para eliminar metales extracelulares. Los pellets celulares fueron secados por 3 días a 60°C y se determinaron los pesos secos. La digestión se realizó con HNO₃ grado metales traza (Fisher Scientific, Hampton, NH. No. Cat. A509P500) durante 12 horas y posteriormente se hirvieron las muestras en tubos de polipropileno 3 veces durante 15 minutos. Finalmente, se procedió con la cuantificación de micro y macronutrientes mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Los datos obtenidos fueron validados mediante Anova unifactorial seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey usando GraphPad Prism Version 6.01 (La Jolla, CA).

6.7 Análisis bioinformático

6.7.1 Obtención de secuencias y su análisis:

A partir de la base de datos de *U. maydis* MUMDB (*MIPS Ustilago maydis* Data Base) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/Search/index.html>) fueron obtenidas las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los marcos de lectura abierto um00096, um03110 y um00264, los cuales son nombrados en éste trabajo UmZRT1, UmZRT2 y umZAP respectivamente (cabe señalar que no se encontraron secuencias tipo ZRT3). Las

secuencias proteicas obtenidas fueron alineadas con proteínas de diferentes hongos en las bases de datos NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Pfam (Finn et al. 2014) (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), Uniprot (The UniProt Consortium, 2018) (<http://www.uniprot.org/>) e InterProScan (Jones et al. 2014) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), de esa manera se determinó la función hipotética de UmZrt1p, UmZrt2p y UmZapp.

6.8 Conformación proteica y topología de UmZrt1p y UmZrt2p:

Para la predicción de la topología de las proteínas, se utilizó el servidor PSIPRED con el algoritmo MEMSAT-SVM (Buchan et al. 2013) y después se compararon los resultados con los obtenidos en los programas de predicción de dominios transmembranales ExpasyTMPred (Hofmann and Stoffel 1993), HMMTOP (Tusnády and Simon 2001), Protter version 1.0 (Omasits et al. 2014) y finalmente con las estructuras probables anotadas en la base de datos de UniProt (The UniProt Consortium 2018). Para la predicción de la localización celular de las proteínas, se usó el predictor de localización subcelular de proteínas eucariotas DeepLoc1.0 predictor (Almagro-Armenteros et al. 2017).

La predicción de los dominios funcionales y la determinación de los porcentajes de identidad se realizó mediante alineamientos utilizando la herramienta de búsqueda básica de alineamiento local del NCBI (BLAST[®]) y el algoritmo protein BLAST (blastp) (NCBI Resource Coordinators 2016).

6.9 Predicción de la unión de factores de transcripción en los promotores de UmZRT1, UmZRT2.

Se analizaron los promotores (1000 pb río arriba del ORF) de UmZRT1 y UmZRT2 con el propósito de identificar si contenían sitios consenso para la unión de factores de transcripción (Rim101p y Nrg1p) en respuesta a variaciones de pH, con ayuda de la base de datos YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking) (Teixeira et al. 2018).

6.10 Alineamiento de secuencias:

Fue llevado a cabo en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) y en ApE plasmid editor, disponible en línea (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

6.11 Casetes de expresión y fusión con mCherry de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP.

La construcción *in silico* de casetes de expresión de genes marcados con mCherry se llevó a cabo tal como se muestra en las figuras S14-S16; se realizó el diseño de los oligonucleótidos enlistados en la tabla S5 para la amplificación de los fragmentos y su posterior unión mediante recombinación homóloga tal como lo describen Yu et al. 2004. Posteriormente se amplificaron los fragmentos antes mencionados para cada uno de los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP correspondientes a: promotor y ORF del gen, linker [GGTGGAAAGTGGTGGAGGCTCAGGAGGC (para dar estabilidad a la proteína expresada)] y mCherry y finalmente la región terminadora del gen a marcar, utilizando la enzima Platinum Taq DNA polymerase High fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA. No. Cat. 11304011), las reacciones se realizaron como se describe en la tabla 5, con el programa mostrados anteriormente (Tabla 6), a una Tm de 54°C con todos los oligonucleótidos. Para la verificación de los pesos moleculares de los fragmentos, se procedió a correr un gel de agarosa al 1% a 90 voltz.

VII. RESULTADOS

7.1 Identificación y análisis de genes relacionados con el transporte de zinc en *U. maydis*

El análisis *in silico* reveló dos genes con supuesta función de transporte de zinc en la secuencia del genoma de *U. maydis* (Mewes et al. 2004; Kämper et al. 2006). Estos genes corresponden a los números de identificación de los marcos de lectura abierta um00096 y um03110 y basado en su función predicha se renombraron a UmZRT1 y UmZRT2, respectivamente. Estos genes se encuentran en el cromosoma 1 (UmZRT1) y 7 (UmZRT2) y la topología predicha de ambas proteínas, UmZrt1p y UmZrt2p, sugirió ocho dominios transmembranales en la membrana plasmática, con un gran bucle citosólico entre los dominios tercero y cuarto. Se predijo que sus dos extremos amino y carboxilo se enfrentan al espacio extracelular. UmZrt2p mostró una cadena de aminoácidos extracelular más grande antes del primer dominio transmembranal en comparación con umZrt1p (Fig. 3). Las predicciones de estructura se realizaron como se describe en Materiales y Métodos y mostraron ligeras variaciones entre los métodos de predicción con respecto a los puntos finales de los aminoácidos en cada dominio transmembranal (tabla 8).

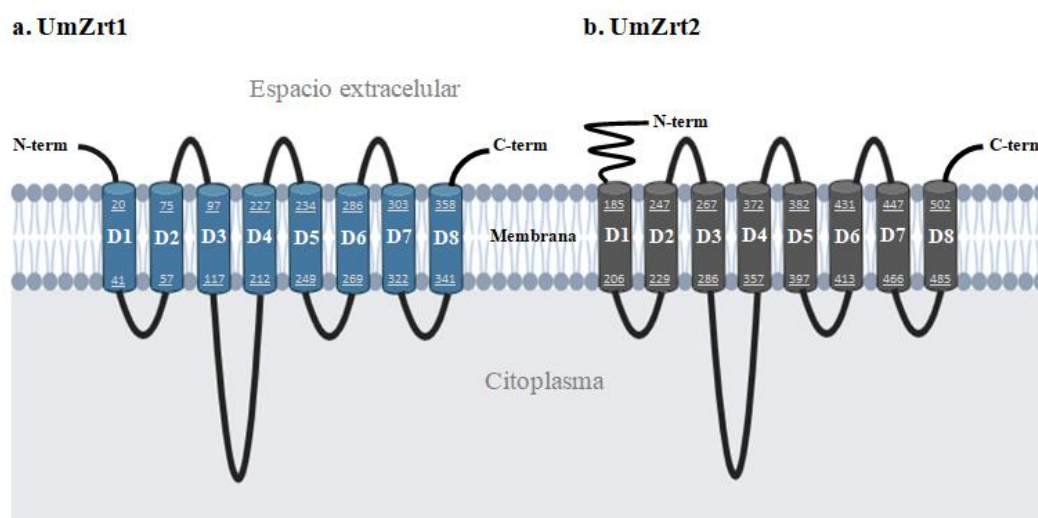


Figura 3. Predicción *in silico* de la topología de UmZrt1p y UmZrt2p en la membrana. Ambas proteínas a) UmZrt1 y b) UmZrt2 tienen ocho dominios transmembranales predichos (D1-D8) con los extremos N y C-terminales hacia el espacio extracelular. Los números que se muestran en cada dominio corresponden a los aminoácidos que los componen.

Tabla 8. Diferencias en las predicciones de los dominios transmembranales de acuerdo al software usado. Todos los programas usados predijeron 8 dominios transmembranales con leves variaciones en los puntos finales de cada dominio.

Protein	Domain	PSIPRED	ExpasyTMPred	Protter version 1.0	UniProt database	HMMTOP
UmZrt1p	1	20-41	22-41	18-40	18-40	22-41
	2	57-75	60-79	60-78	60-78	60-79
	3	97-117	98-118	98-118	98-118	98-116
	4	212-227	209-227	206-227	206-227	206-225
	5	234-249	215-249	233-257	233-257	234-252
	6	269-286	265-288	269-288	269-288	265-288
	7	303-322	301-318	308-329	308-329	297-320
	8	341-358	341-359	341-361	341-361	341-359
UmZrt2p	1	185-206	13-33	183-207	183-207	193-212
	2	229-247	190-213	228-248	228-248	233-252
	3	267-286	226-248	268-290	268-290	267-286
	4	357-372	266-287	352-372	352-372	355-374
	5	382-397	364-387	378-397	378-397	379-398
	6	413-431	412-432	409-432	409-432	413-432
	7	447-466	444-463	444-464	444-464	445-464
	8	485-502	485-505	485-505	485-505	485-504

Un análisis comparativo de los posibles transportadores de zinc de *U. maydis* mostró un alto porcentaje de identidad con otros transportadores de metales. Por ejemplo; la secuencia codificante de UmZRT1 (número de acceso de GenBank MF177953) predice una proteína de 362 aminoácidos y la mayoría de la secuencia de aminoácidos de UmZrt1p (aminoácidos 18-359) tiene 32.81% de porcentaje de identidad con el dominio funcional característico de la familia ZIP. De manera similar, la secuencia codificante del gen UmZRT2 (número de acceso de GenBank MF177954) predice una proteína de 506 aminoácidos y la herramienta básica de búsqueda por alineamiento local (BLAST) de NCBI identificó la presencia de varios dominios conservados. Un dominio corresponde al típico de la superfamilia ZIP (aa 182-506) con 32.54% de identidad, un segundo dominio (aa 182-506) tiene 29.79% de identidad a PLN02159 en *Arabidopsis*, característica de las proteínas transportadoras Fe⁺² y un tercer dominio (aa 352-502) que está relacionado con COG0428 de la superfamilia cl00437 con 29.50% de identidad, cuya función hipotética es el transporte de metales divalentes en los organismos *Archaea*. Finalmente, los aminoácidos 141-166 de UmZrt2p también comparten una identidad del 36% con una porción del componente periplásmico ZnuA de transportadores de zinc ZnuABC de alta afinidad que se encuentran en organismos procariotas (Coordinadores de recursos de NCBI 2016) (Finn et al. 2014) (Fig. 4).

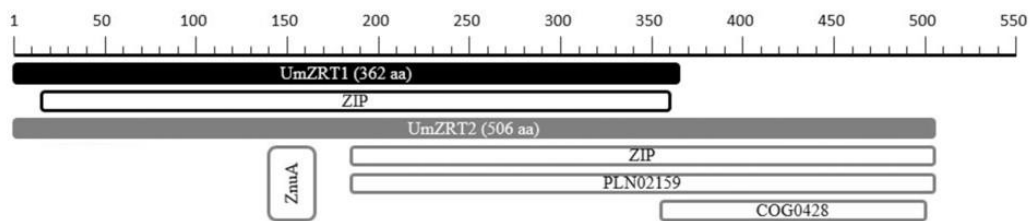


Figura 4. Predicción de dominios funcionales de UmZrt1p y UmZrt2. La longitud y los dominios funcionales de ambas proteínas se muestran en colores negro y gris, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, un punto clave para lograr la homeostasis de zinc en los hongos es mediante el transporte del metal en la vacuola, en *S. cerevisiae* se encontró al transportador vacuolar de zinc ZRT3. En este estudio se realizó la búsqueda de un posible transportador tipo Zrt3p en *U. maydis* mediante alineamientos locales mediante BLAST, sin embargo, no se logró encontrar alguna proteína que presentara suficiente porcentaje de identidad y dominios relacionados con el transporte de zinc. La única proteína identificada en *U. maydis* con un 23% de identidad respecto a Zrt3p de *S. cerevisiae* (Fig. 5b y S3), fue Um10685 cuyos dominios identificados corresponden a una región MBF1 (de multiprotein bridging factor) que media la activación de la transcripción dependiente de GCN4, función diferente al transporte de zinc y además esta no presentó el característico dominio ZIP (Fig. 5c), mientras que en la proteína Zrt3p de *S. cerevisiae* si se identificó dicho dominio funcional (aa 8-93 y 293-451) (Fig. 5a). Debido a lo anterior expuesto, la caracterización del transporte vacuolar mediada por un transportador tipo Zrt3p, no fue llevada a cabo en el presente estudio.

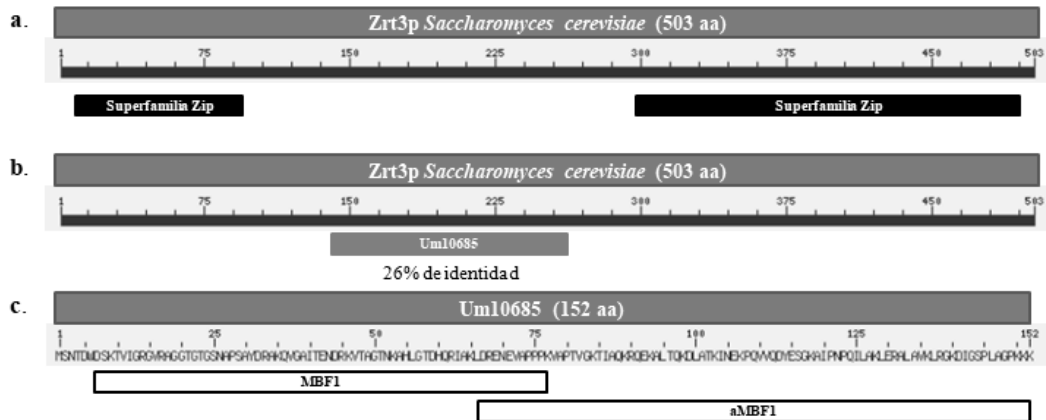


Figura 5. Comparación de Zrt3p de *S. cerevisiae* con Um10685. a. Representación de Zrt3p de *S. cerevisiae*, se muestran sus dominios funcionales Zip. b. Se presenta el bajo porcentaje de identidad entre Zrt3p de *S. cerevisiae* y Um10685 (26%). c. Se observan los dominios funcionales presentes en Um10685 correspondientes a MBF1 y la carencia del dominio Zip.

La expresión de los transportadores tipo Zrt pertenecientes a la familia ZIP, es principalmente regulada por el factor de transcripción ZAP, al realizar su búsqueda en *U. maydis* mediante alineamientos con BLAST, se identificó al gen Um00264 cuya proteína codificada presenta un 42.26% de identidad con la proteína Zapp de *S. cerevisiae* (GenBank id: PTN40135.1) (Fig. S4), a la cual, en este estudio denominamos UmZAP y codifica para una proteína de 836 aminoácidos, donde se encuentran varios sitios de unión a zinc y dedos de zinc C2H2, además presenta un dominio COG5048 (aa 292-761) que se predice pudiera corresponder a dedos de zinc de la familia FOG y por último se encuentran 2 regiones ZF-H, que son dedos de zinc con doble dominio. Al comparar a UmZapp con Zapp de *S. cerevisiae* (880 aa) encontramos que ambas presentan múltiples regiones de dedos de zinc y sitios de unión para este metal, así como los dominios COG5048 y ZF-H, la única diferencia que se identificó fue un dominio Zap1_zf2 (Zap1 zinc finger 2) en Zapp de *S. cerevisiae*, que UmZapp no presentó tal como se muestra en la figura 6. Cabe señalar que en el presente estudio se muestran avances en la caracterización de UmZAP, pero este se enfoca principalmente en UmZRT1 y UmZRT2, por lo que se continuará con el estudio de UmZAP en posteriores proyectos.

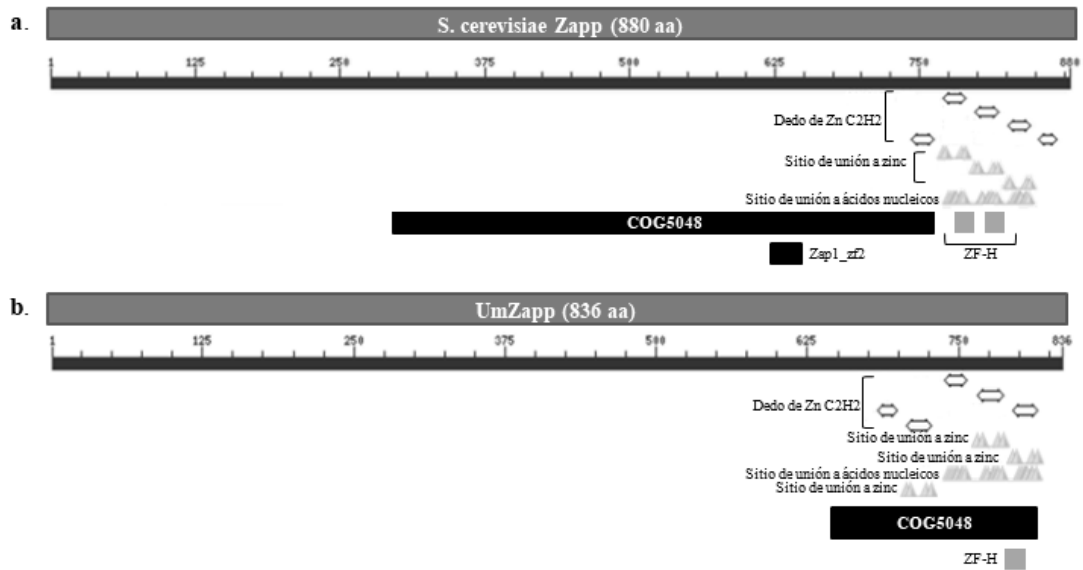


Figura 6. Comparación de UmZapp y Zapp de *S. cerevisiae*. a. Proteína Zapp de *S. cerevisiae* con 880 aminoácidos. En el inciso b. Se muestra a UmZapp de 836 aminoácidos. Ambas proteínas presentan múltiples sitios de unión a zinc y regiones tipo dedo de zinc C2H2, así como los dominios COG5048 y ZF-H, mientras que Zap1_zf2 sólo se encontró en Zapp de *S. cerevisiae*.

7.2 Las secuencias de aminoácidos UmZrt1p y UmZrt2p comparten similitud con las proteínas Zrt/Irt de otros organismos

Mediante el análisis de comparación de secuencias de aminoácidos a través de la herramienta BLAST y el algoritmo blastp de NCBI, encontramos que las proteínas de varios otros organismos tienen porcentajes significativos de identidad con UmZrt1p y UmZrt2p. Sin embargo, también se encontraron diferencias importantes. Por ejemplo, a nivel de aminoácidos, estas proteínas de *Ustilago maydis* mostraron solo un 30-44% de identidad con las proteínas Zrt de *S. cerevisiae* como se muestra en los alineamientos de secuencias de aminoácidos (Fig. S2, S3). Además, se encontraron variaciones con *Arabidopsis thaliana* y *Mus musculus* a pesar de tener el dominio funcional ZIP típico (Fig. 7). Además, UmZrt1p solo comparte el 31% de identidad con su supuesto homólogo UmZrt2p. Estas diferencias importantes nos llevaron a caracterizar funcionalmente UmZrt1p y UmZrt2p a nivel molecular y fisiológico.

Organismo	Proteína	No. De acceso	Identidad (%)	
			UmZRT1	UmZRT2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zrt1p	AJR76875.1	38.92	30.52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zrt2p	AJV53829.1	35.48	43.67
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Irt1p	NP_567590.3	28.13	30.03
<i>Mus musculus</i>	Zip2p	NP_001034765.2	26.42	22.73
<i>Mus musculus</i>	Zip3p	NP_001345827.2	22.74	21.41

Figura 7. Comparación de la secuencias aminoacídicas de UmZrt1p y UmZrt2p. Se muestra el porcentaje de identidad compartido por las proteínas de *Ustilago maydis* con proteínas similares a Zrt/Irt de levaduras, plantas y animales.

7.3 Caracterización funcional de UmZRT1 y UmZRT2 mediante ensayo de complementación en *S. cerevisiae*

Para determinar si las funciones de los genes UmZRT1 y UmZRT2 son equivalentes a las descritas para ZRT1 y ZRT2 en *S. cerevisiae*, los marcos de lectura abiertos de estos genes de *U. maydis* se amplificaron y clonaron en el plásmido lanzadera pDR195 adecuado para la expresión en *S. cerevisiae* e impulsado por el promotor fuerte PMA1 (Rentsch et al. 1995). Después de la confirmación de la secuencia, estos plásmidos se usaron para evaluar la complementación funcional en la doble mutante ZHY3 de *S. cerevisiae* (zrt1 Δ zrt2 Δ). El análisis de crecimiento en medios líquidos con bajo contenido de zinc (LZM) se realizó en un rango de concentraciones de zinc. UmZRT1 y UmZRT2 se transformaron en ZHY3 y su crecimiento se midió independientemente en experimentos por triplicado para cada conjunto de transformantes. La figura 8 muestra las medias de las densidades celulares de dos transformaciones independientes por construcción después de 15 h de cultivo. Mientras que las células ZHY3 transformadas con el vector vacío crecieron pobremente en todas las concentraciones de zinc probadas, las células que expresan UmZRT1 mostraron un crecimiento de respuesta a la dosis similar a las células que expresan ZRT1 de *S. cerevisiae*. Por el contrario, las células complementadas con UmZRT2 no mostraron un fenotipo de complementación a bajas concentraciones de zinc (1–100 μ M), sino una fuerte complementación a una mayor concentración de ZnCl₂ (1000 μ M) (Fig. 8a). Se observó una dependencia similar de la dosis de zinc en la complementación de esta cepa mutante con ZRT2 de

S. cerevisiae (Zhao y Eide 1996b). Estos resultados sugieren que tanto UmZRT1 como UmZRT2 codifican transportadores funcionales de zinc y proporcionan evidencia que sugiere que UmZrt1p es un transportador de zinc de alta afinidad, similar a Zrt1p de *S. cerevisiae*, mientras que UmZrt2p tiene una menor afinidad por el zinc. Estos ensayos también se realizaron en medios sólidos (LZM) y los resultados fueron consistentes con los obtenidos de cultivos líquidos (Fig. 8b). Mientras que ZRT1 de *S. cerevisiae* y UmZRT1 complementaron la cepa mutante a 1, 10, 100 y 1000 μM de zinc agregado, UmZRT2 solo presentó complementación cuando se agregaron 1000 μM de zinc.

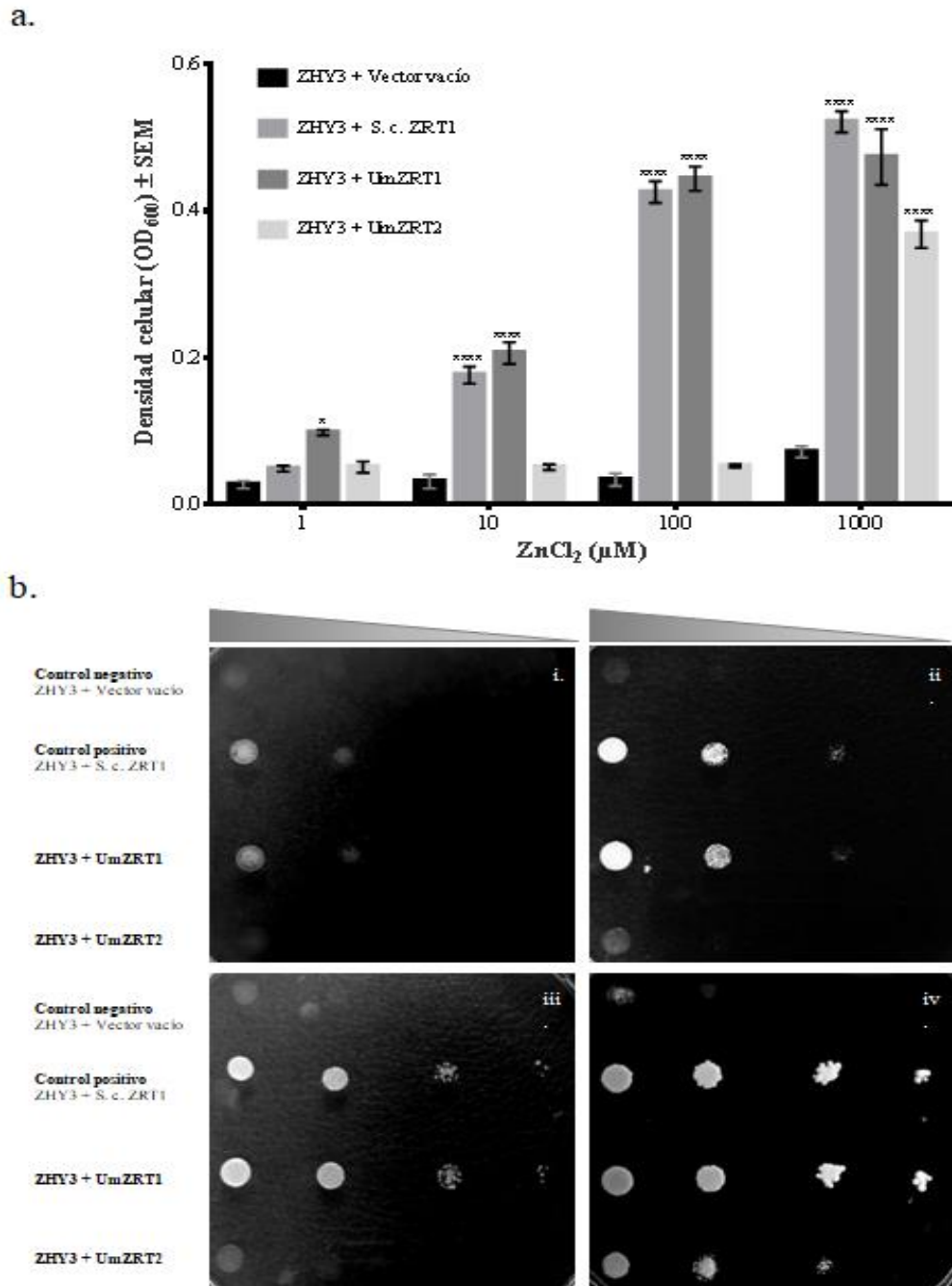
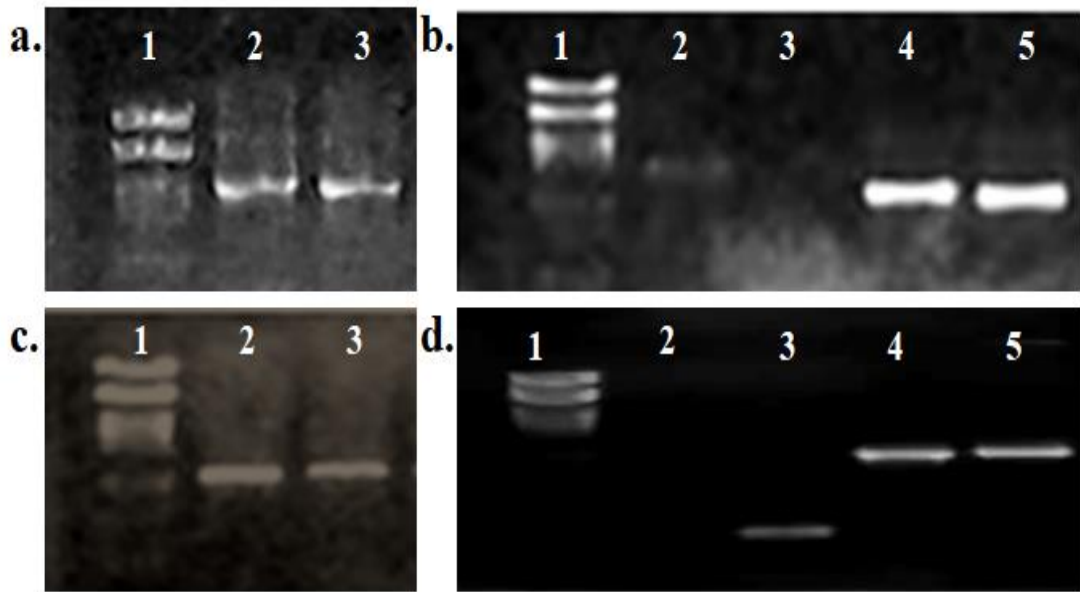


Figura 8. Ensayos de complementación de la capacidad de transportar zinc en células de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan transportadores de zinc de *Ustilago maydis*. a) Las células ZHY3 ($\Delta zrt1 \Delta zrt2$) se transformaron con el vector pDR195 (control negativo), pMC5 (control positivo, ZRT1 de *S. cerevisiae*), pDR195-UmZRT1 y pDR195-UmZRT2. Cada barra representa la media de los triplicados de dos experimentos biológicos para cada tratamiento y se muestra la diferencia estadística entre tratamientos y el control negativo (* $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$). b) Las levaduras transformantes descritas anteriormente (a) se inocularon en placas LZM en gotas que contenían células 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 y 1×10^2 . Los paneles i, ii, iii y iv corresponden a LZM más 1, 10, 100, 1000 μM de ZnCl_2 , respectivamente.

7.4 Caracterización funcional de los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP en *Ustilago maydis*

7.4.1 Generación de mutantes

Para obtener más información sobre la función nativa de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP, generamos mutantes donde el ORF correspondiente en *U. maydis* fue reemplazado por recombinación homóloga con un marcador de selección (Hyg). Para la generación de los casetes de reemplazo se procedió según lo descrito en Materiales y Métodos. Fueron obtenidos los fragmentos correspondientes a la región promotora (P) y terminadora (T) de los genes UmZRT1, UmZRT1 y UmZAP, así como el correspondiente al marcador de selección higromicina (Hyg) (Fig. 9).



Carril	Muestra	Amplicón (pb)
a1	ADN del fago lambda cortado con PstI	-
a2 – a3	ORF de Hyg	2355
b1	ADN del fago lambda cortado con PstI	-
b3	Control negativo	-
b4	Promotor UmZRT1	1079
b5	Terminador UmZRT1	973
c1	ADN del fago lambda cortado con PstI	-
c2	Promotor UmZRT2	1112
c3	Terminador UmZRT2	977
d1	ADN del fago lambda cortado con PstI	-
d2	Control negativo	-
d3	Actina	242
d4	Promotor UmZAP	994
d5	Terminador UmZAP	1028

Figura 9. Fragmentos amplificados para su fusión y obtención de los casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP. Se muestra la electroforésis de las secuencias amplificadas en agarosa al 1% a 90 V.

Posteriormente se procedió a realizar la fusión mediante la técnica de doble unión (double joint), donde se obtuvieron los barridos característicos de este procedimiento (Fig. 10). Una vez obtenidas las fusiones de los casetes de reemplazo para los tres genes de interés se utilizaron como molde para la amplificación de los

casetes con oligonucleótidos anidados, obteniendo los tamaños esperados y después fueron purificados (Fig. 11).



Figura 10. Fusiones de los fragmentos y obtención de los casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP. Se muestra la electroforesis de las secuencias fusionadas y amplificadas en agarosa al 1% a 90 V.

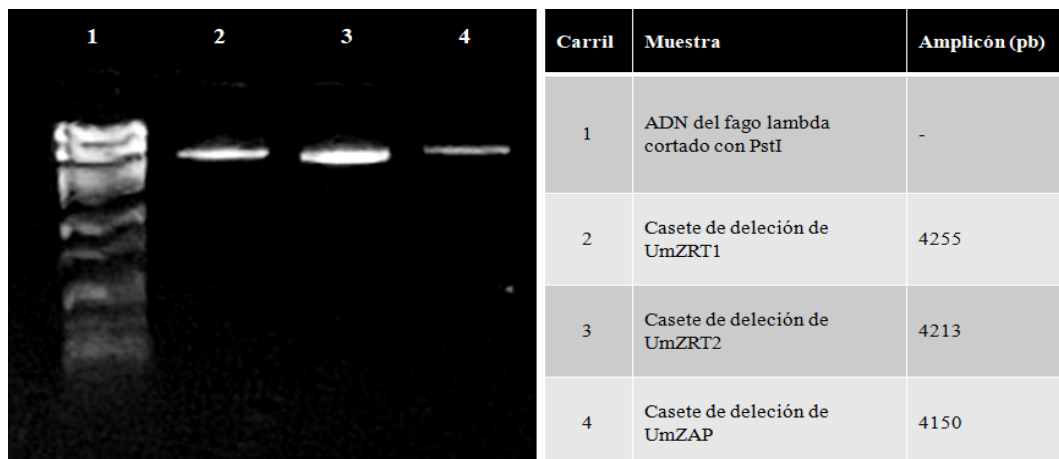


Figura 11. Casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP. Se muestra la electroforesis de los casetes de reemplazo, amplificadas con oligonucleótidos anidados, en agarosa al 1% a 90 V.

Para la aplicación de la técnica de división del marcador, se realizaron las amplificaciones de las regiones 5' y 3' que comprendían del inicio del P a la parte media de la Hyg y de la parte media de la Hyg al final del T respectivamente de cada uno de los casetes de reemplazo (utilizando oligonucleótidos anidados de P y T) (Fig. 12).

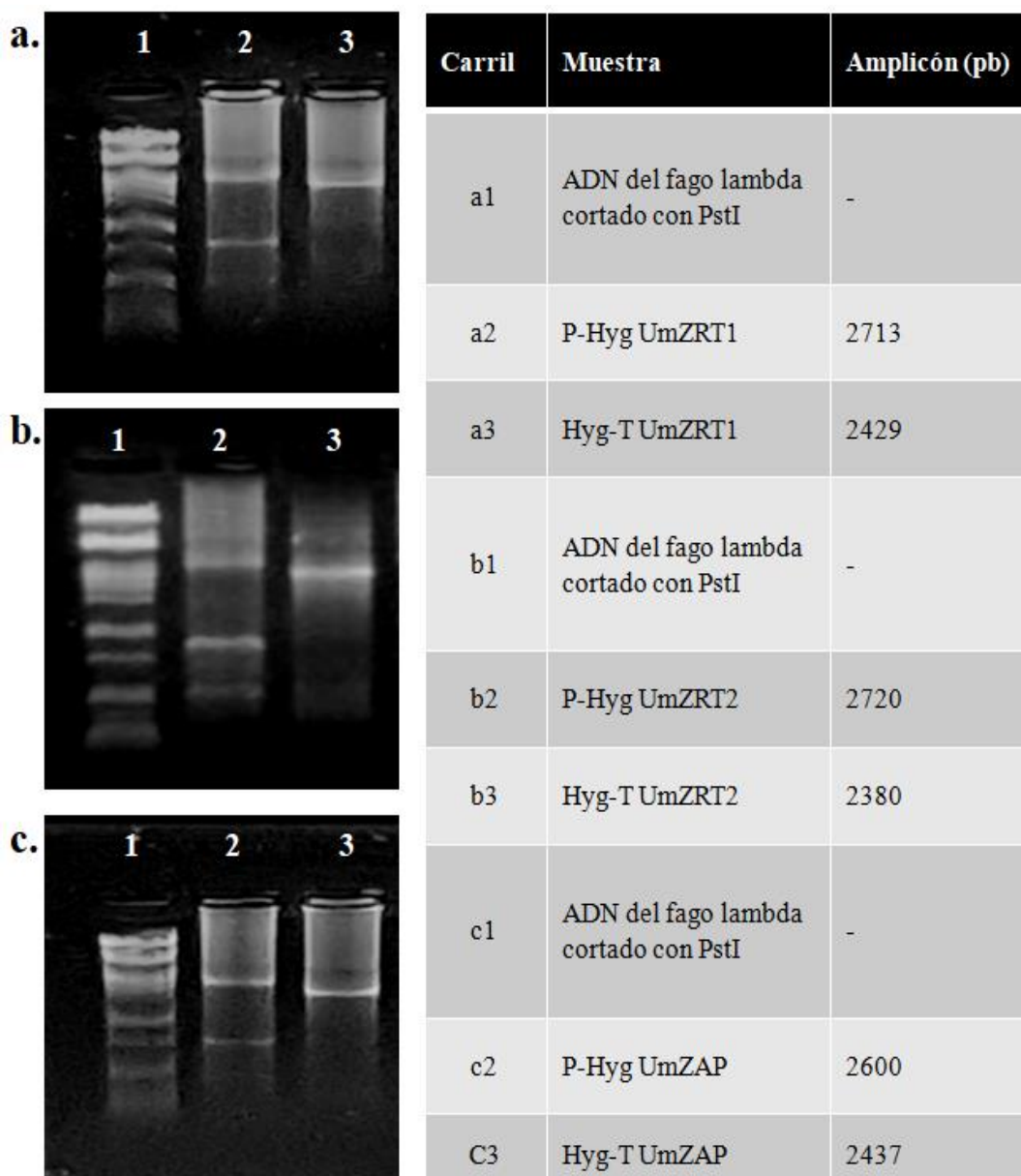


Figura 12. División de los casetes de reemplazo en 2 fragmentos para la técnica de división de marcador (split marker). Se muestra la electroforesis de los fragmentos de promotor a higromicina (P-Hyg) y de higromicina a terminador (Hyg-T) de los casetes de reemplazo de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP, en gel de agarosa al 1%, corridos a 90V.

Con el objetivo de obtener las mutantes, se generaron protoplastos de la cepa FB1 (Fig. 13) y fueron transformados con los fragmentos 5' y 3' de cada casete de reemplazo, logrando una triple recombinación en el respectivo locus y produciendo la mutación de los marcos de lectura abierto (ORF) de los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP; lo cual fue comprobado mediante su caracterización genotípica y fenotípica (UmZAP no fue comprobado por todos los métodos usados para UmZRT1 y UmZRT2). Primeramente, se detectó la presencia del marcador de selección en las mutantes de los tres genes (Fig. 14) y se caracterizó el crecimiento de las cepas FB1, Δ UmZRT1 y Δ UmZRT2 en medio completo sin Hyg como control y con 700 μ g/ml de Hyg, donde se observó crecimiento de las tres cepas en el control, mientras que en el medio con Hyg sólo se presentó crecimiento de Δ UmZRT1 y Δ UmZRT2 con aspecto polvoroso y plano, confirmando la expresión del marcador de selección (Fig. 15).

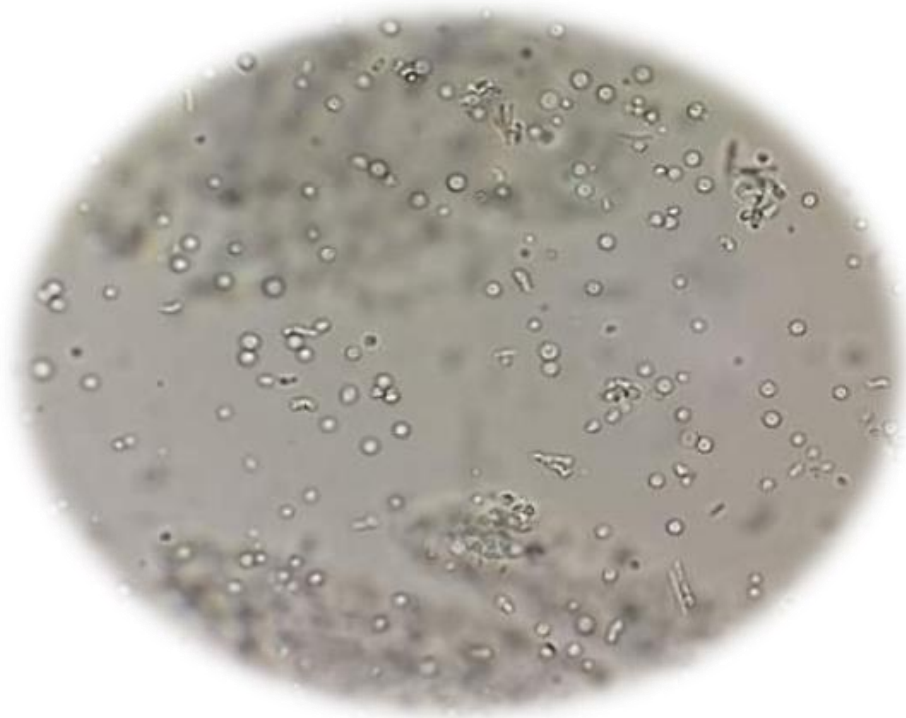


Figura 13. Protoplastos generados para su posterior transformación con los casetes divididos.

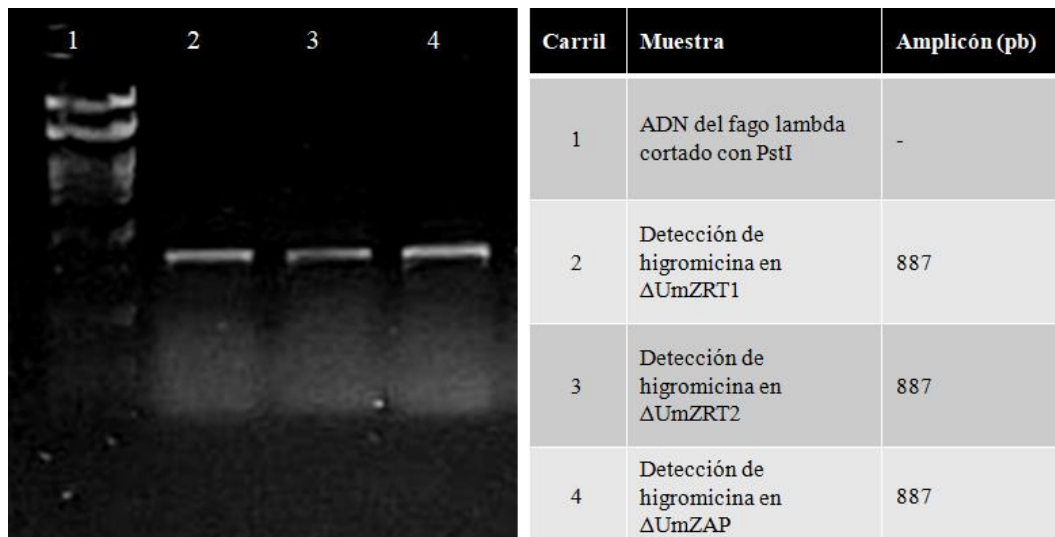


Figura 14. Detección del marco de lectura abierto de higromicina en Δ UmZRT1, Δ UmZRT2 y Δ UmZAP. Electroforesis de la amplificación de higromicina en las mutantes, con oligonucleótidos de detección, en gel de agarosa al 1% a 90V.

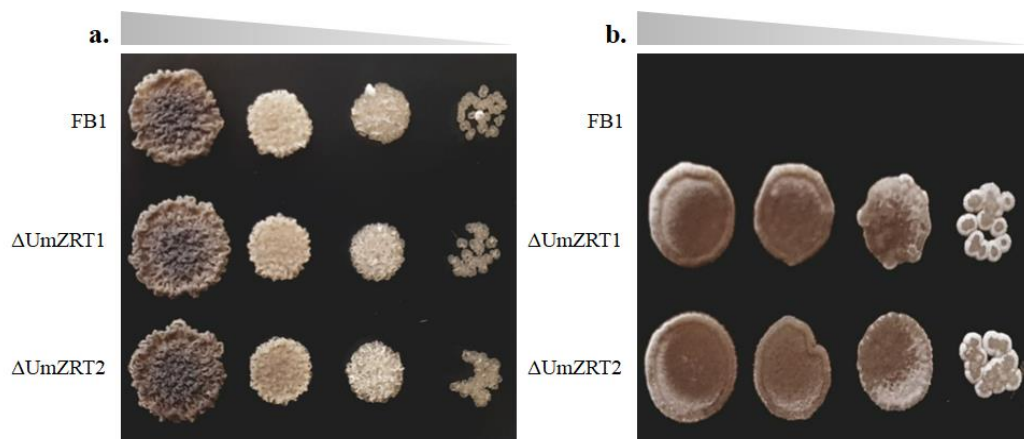


Figura 15. Caracterización del crecimiento de mutantes en medio completo sin y con higromicina. Las cepas fueron inoculadas partiendo de 10^5 hasta 10^2 células. a) Medio completo sin higromicina. b) Medio completo con 700 μ g/ml de higromicina.

Para identificar la mutación en los loci correspondientes, se realizó la comprobación mediante la amplificación de las regiones 5' y 3' en el ADN de las 3 mutantes (utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido externos) (Fig. 16).

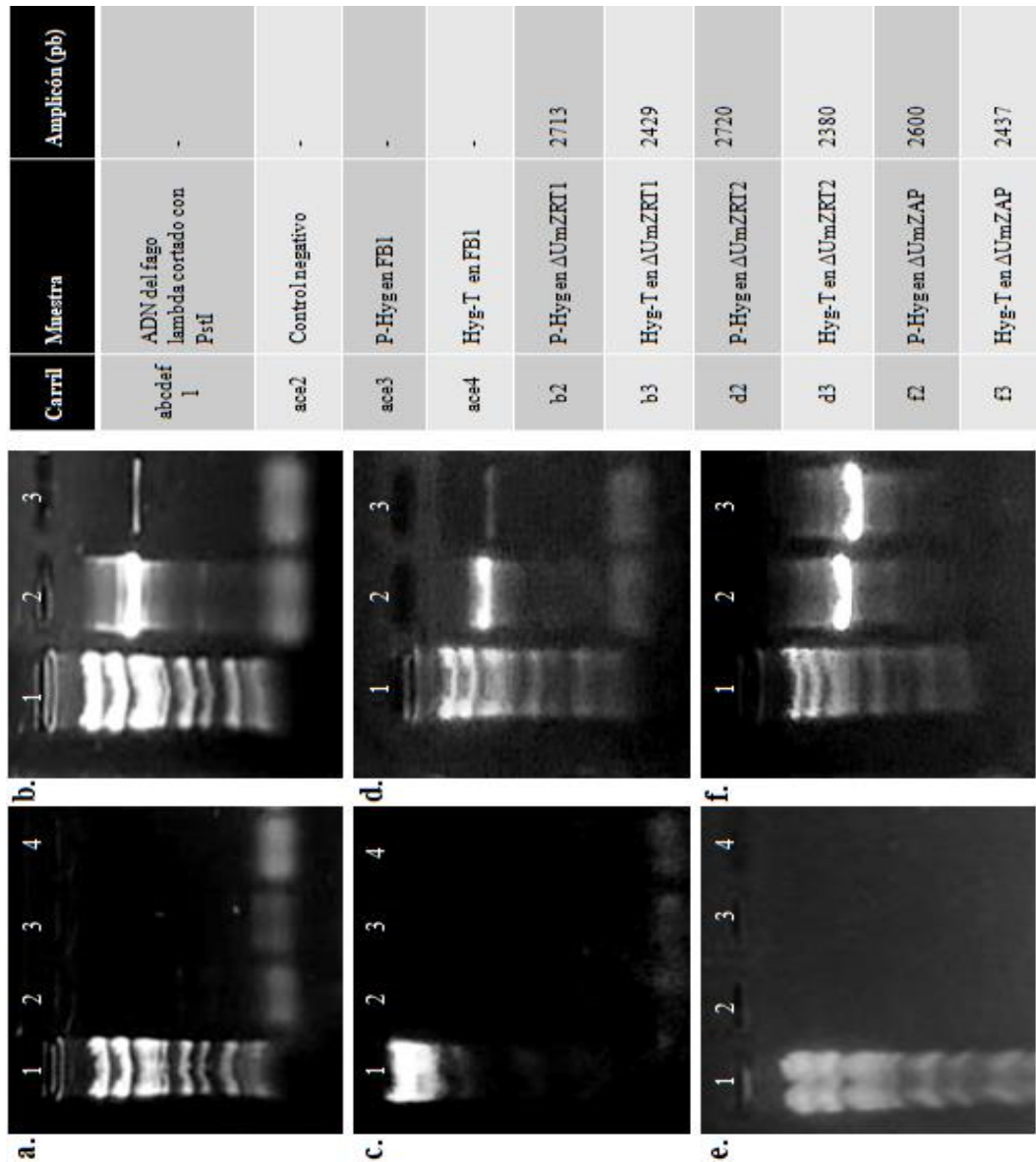


Figura 16. Caracterización de Δ UmZRT1, Δ UmZRT2 y Δ UmZAP mediante la amplificación de los fragmentos P-Hygen y de Hyg-T. Se muestra la electroforesis de reacciones de PCR con oligonucleótidos externos de P y T para la amplificación de los fragmentos P-Hygen y de Hyg-T en agarosa al 1% a 90 V. **a, c y e)** Electroforesis de las reacciones de PCR realizadas utilizando como molde ADN de FB1. **b, d y f)** Electroforesis de las reacciones de PCR realizadas utilizando como molde ADN de Δ UmZRT1, Δ UmZRT2 y Δ UmZAP respectivamente.

Además se realizó la caracterización mediante restricción enzimática de los loci amplificados de Δ UmZRT1 y Δ UmZRT2 (con oligonucleótidos externos), con las enzimas EcoRI y PstI para Δ UmZRT1 y PstI para Δ UmZRT2, obteniendo los fragmentos esperados tal como se muestra en la Fig. 17. Finalmente se realizó la secuenciación de las amplificaciones de los loci de mutación, con lo que se comprobó la recombinación de los casetes de reemplazo y mutación correcta de los genes UmZRT1 y UmZRT2 (ver datos complementarios).

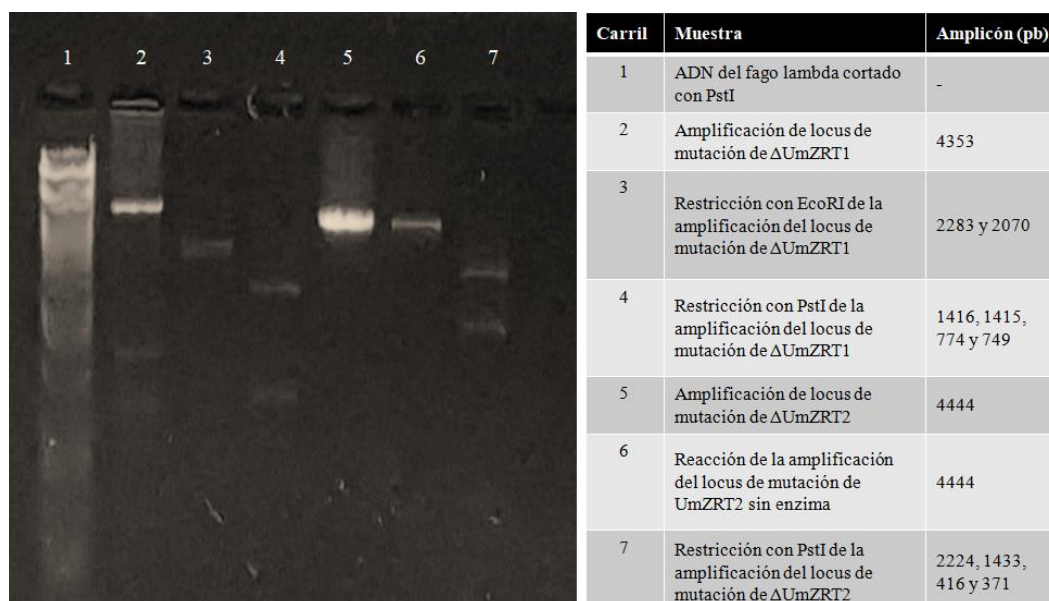


Figura 17. Caracterización de mutantes por restricción enzimática. Se muestran los cortes realizados por las enzimas EcoRI y PstI en la amplificación del locus donde se recombinó el casete de reemplazo de Δ UmZRT1. Por otra parte en Δ UmZRT1 la restricción fue realizada con PstI.

7.5 Caracterización de la composición elemental mediante ICP-OES.

Después de confirmar por PCR y secuenciar que las inserciones habían tenido lugar en los loci correctos se procedió a realizar la caracterización funcional de las cepas FB1 y mutantes de los genes UmZRT1 y UmZRT2 mediante la determinación cuantitativa de la composición elemental por ICP-OES y de manera cualitativa mediante la visualización de su crecimiento ante concentraciones crecientes de zinc, para ello, fue fundamental estandarizar el tratamiento previo que se debe dar a estas células, tal como se describe a continuación:

7.5.1 Tratamiento de células para su caracterización

Los micronutrientes se requieren en concentraciones muy bajas para el correcto desarrollo celular, como ya se ha mencionado previamente, están estrictamente regulados por las células en todos los niveles filogenéticos. Esto representó un desafío para nuestros experimentos de caracterización de crecimiento y cuantificación de nutrientes intracelulares por ICP-OES, debido a que las células normalmente acumulan reservas de nutrientes y a pesar de someterlas a crecimiento en medios deficientes de ciertos metales o nutrientes, estas crecen sin complicación, ya que cuentan con lo necesario para su crecimiento en sus reservas. Por todo lo anterior, tuvimos que adecuar los protocolos de estrés nutritivo que se utilizaban previamente en *Ustilago maydis*, para lograr agotar los nutrientes presentes en las células y que siguieran siendo viables, logrando finalmente lo que nosotros nombramos el “efecto zebra” (llamado así por su aspecto rayado al observar las células al microscopio y cabe señalar que no hemos encontrado reportes de este fenotipo hasta la fecha en *Ustilago maydis*), donde la célula se somete a un agotamiento de los nutrientes intracelulares, lo cual produce la fragmentación de vacuolas y ampliación de las mismas, lo que puede ser un mecanismo para incrementar la eficiencia de la toma de iones por los transportadores vacuolares ante la deficiencia de nutrientes, tal como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Li & Kane 2009) (Fig. 18).

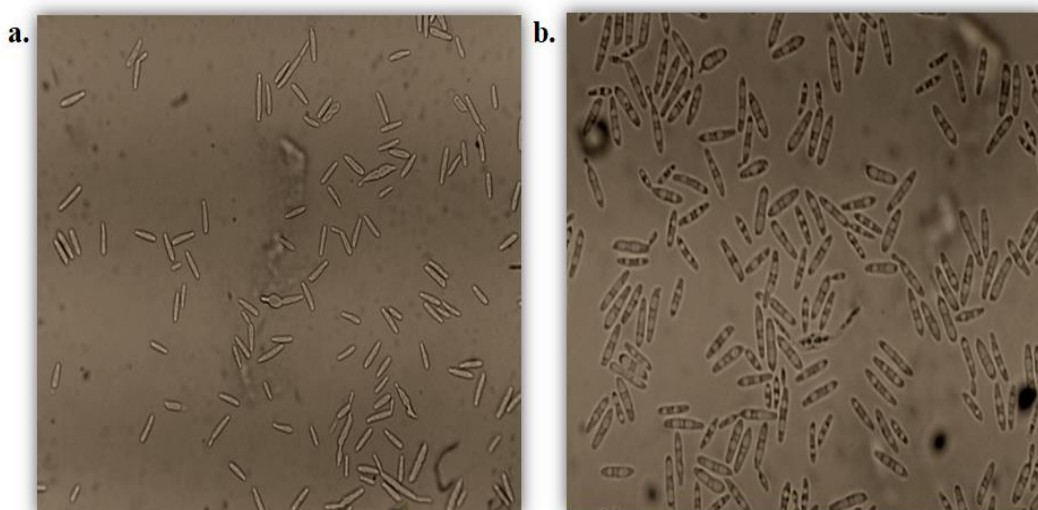


Figura 18. Fenotipo de células de *Ustilago maydis* antes y después del estrés nutritivo. Se muestran células de la cepa FB1 crecidas en medio mínimo a pH 7 antes (inciso a) y después (inciso b) de realizarles el tratamiento de estrés nutritivo.

Después del tratamiento de estrés nutritivo, se realizó la cuantificación de la composición elemental de las células por ICP-OES. La figura 19 muestra que las células Δ UmZRT1 cultivadas en YNB durante 15 horas sin zinc adicional agregado presentaron niveles de Zn por debajo del límite de detección (0.005 ppm) y significativamente diferentes en comparación con la cepa silvestre FB1 (Fig. 19a). Curiosamente, Δ UmZRT2 tienen niveles detectables de Zn pero estos también fueron significativamente más bajos que FB1. Se observó un patrón similar con células cultivadas en YNB con 1, 10 y 100 μ M adicionales de $ZnCl_2$ (Fig. S5).

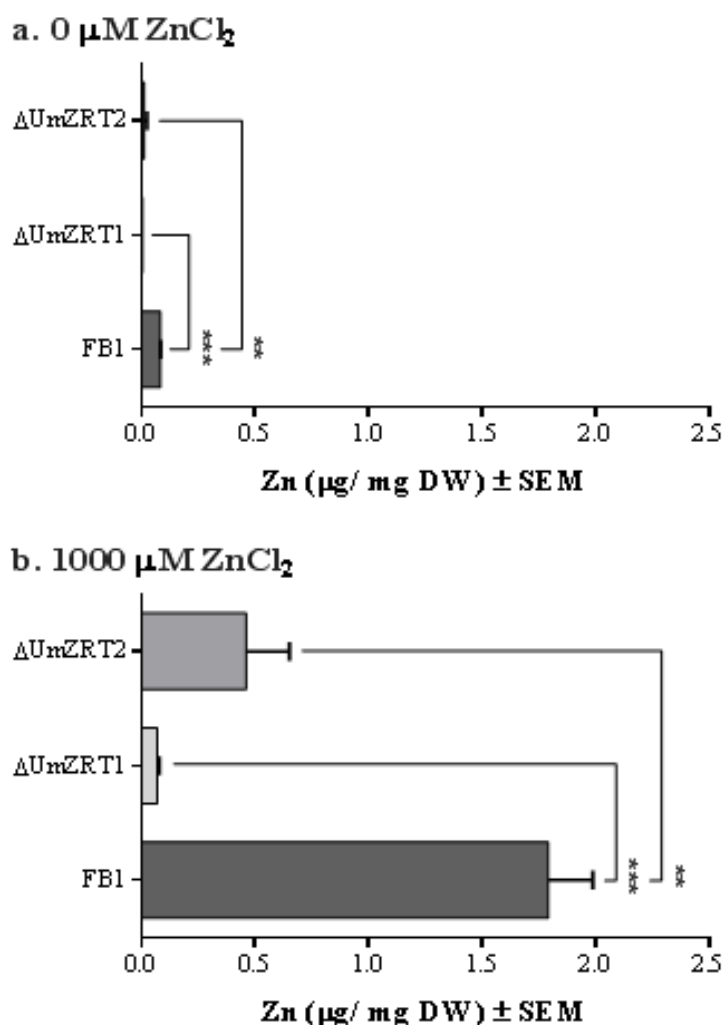


Figura 19. Cuantificación de zinc por ICP-OES. a) Determinación del contenido de zinc en peso seco de células cultivadas en YNB sin adición de zinc. **b)** Medida del contenido de zinc en peso seco de células cultivadas en YNB suplementado con $ZnCl_2$ 1000 μ M. Cada barra representa la media de los triplicados biológicos en cada tratamiento y se muestra la diferencia estadística entre FB1 y las mutantes ZRT (** p < 0.01 y *** p < 0.001).

En los medios YNB que contenían 1000 μM adicionales de ZnCl_2 , ΔUmZRT1 mostró un ligero aumento de la concentración de zinc, en comparación con YNB sin agregar Zn, mientras que ΔUmZRT2 mostró concentraciones de zinc más altas, aunque todavía eran significativamente más bajas que las de la silvestre (Fig. 19b). En particular, la mutación de UmZRT1 o UmZRT2 no tuvo impacto en la acumulación de hierro en comparación con la silvestre (Fig. S6), lo que sugiere que estas proteínas juegan poco o ningún papel en el transporte de hierro. Los niveles de manganeso estaban por debajo del límite de detección para todas las cepas. En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que UmZRT1 codifica un transportador de alta afinidad por el zinc, mientras que UmZRT2 es un transportador de baja afinidad por el zinc según lo predicho por los experimentos de homología de secuencia y complementación funcional en *S. cerevisiae* descritos al inicio de esta sección.

La capacidad de crecimiento de la cepa silvestre de *Ustilago maydis* y las mutantes UmZrt1 y UmZrt2 también se determinó en placas YNB sólidas suplementadas con 1, 10, 100 y 1000 μM de ZnCl_2 . ΔUmZRT1 mostró menos crecimiento que la ΔUmZRT2 y la cepa silvestre, excepto a la concentración de zinc más alta probada donde ΔUmZRT1 mostró un crecimiento comparable a las otras cepas. Estos resultados fueron consistentes con un transportador de zinc de alta afinidad defectuoso y además respalda que UmZRT2 codifique un transportador de zinc de baja afinidad (Fig. 20).

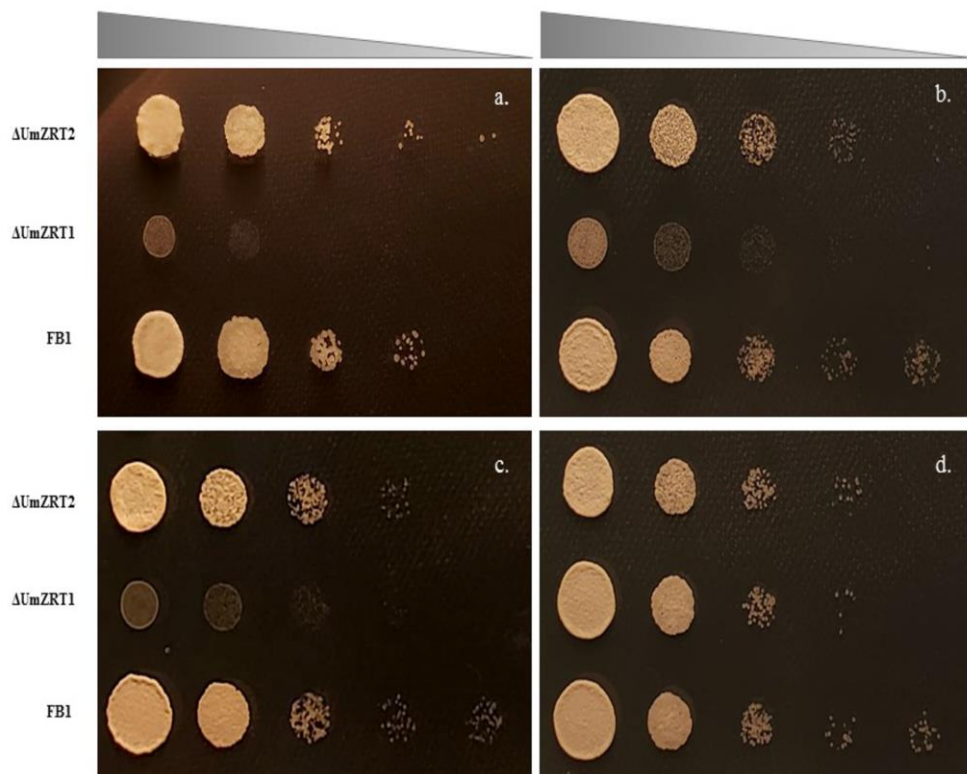


Figura 20. Diferenciación en crecimiento de Δ ZRT1, Δ ZRT2 y FB1 en gradiente de [Zn]. a-d) corresponden a YNB suplementado con 1, 10, 100 y 1000 μ M de ZnCl_2 . Se inocularon por gota las cepas, en las placas a partir de $\text{OD}_{600} = 0,5$ seguido de diluciones seriadas (10 veces).

7.6 Análisis *in silico* de los promotores UmZRT1 y UmZRT2.

Debido a que la regulación de los genes similares a ZRT por los factores de transcripción Zap1p y PacC / Rim101p se ha informado previamente, a través del análisis *in silico*, fue posible buscar posibles sitios de unión para estos factores de transcripción en las regiones río arriba de los marcos de lectura abierta UmZRT1 y UmZRT2. La región promotora de UmZRT1 no tenía ningún sitio de unión consenso para Rim101/PacCp, pero tenía varios supuestos Nrg1p. Se sabe que Nrg1p está regulado por Rim101p en *S. cerevisiae* (Valmik et al. 2005). Por el contrario, el promotor UmZRT2 tenía posibles sitios de unión para los factores de transcripción Rim101p y Nrg1p. Cabe señalar que, a diferencia de los promotores ZRT1 y ZRT2 de *S. cerevisiae*, los genes de *U. maydis* no contienen ninguna de las secuencias consenso previamente informadas para la unión del factor de transcripción Zap1p; que es responsable de regular muchos de los genes transportadores de zinc en la

mayoría de los organismos fúngicos estudiados hasta la fecha (Zhao et al. 1998) (tabla 9).

Tabla 9. Sitios de unión para factores de transcripción con posible regulación de UmZRT1 y UmZRT2. Sitios de unión de consenso para los factores de transcripción Nrg1p y Rim101p en los promotores de UmZRT1 y UmZRT2 y su distancia (pb) con respecto al codón de iniciación ATG.

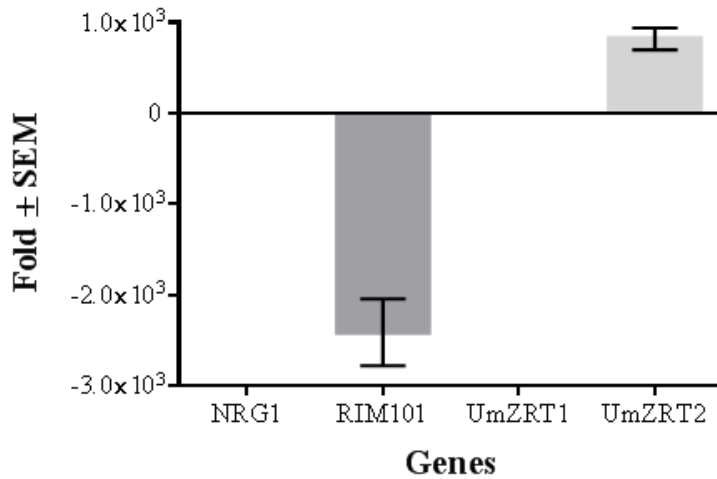
Gene	Transcription factor	Consensus region	Position
UmZRT1	Nrg1p	CCCTC	273
	Nrg1p	CCCTC	214
	Nrg1p	CCCTC	207
	Nrg1p	CCCTC	54
UmZRT2	Nrg1p	CCCCT	256
	Nrg1p	CCCCT	129
	Nrg1p	CCCTC	951
	Nrg1p	CCCTC	255
	Rim101p	TGCCAAG	363

7.7 Análisis de expresión de UmZRT1 y UmZRT2

Para evaluar los niveles de expresión relativa de UmZRT1 y UmZRT2 en respuesta a los cambios en la concentración de zinc en condiciones ácidas y neutras, se midieron los niveles de ARNm junto con los de RIM101 y NRG1 en la cepa silvestre (FB1) y en la mutante de RIM101 (BMA2). Para obtener el cambio de expresión con respecto a la referencia (Fold change) de estos genes, los datos fueron analizados por el método Livak. Como se describe en Materiales y Métodos, el gen de actina se usó como gen de referencia, y se exhibieron niveles constantes de su expresión en todas las muestras. El calibrador utilizado fue FB1 y después de la normalización, el fold change del control fue 1 como constante. Finalmente, los datos de los controles se incorporaron en el fold de los genes de interés. A pH ácido (LZM pH 4.0) UmZRT2 aumentó su expresión ~ 800 veces en BMA2 en comparación con el calibrador FB1, lo que sugiere que PacC/Rim101p es responsable de la represión de UmZRT2 a baja concentración de zinc y pH ácido en la cepa de tipo salvaje (FB1). UmZRT1 y NRG1 no mostraron variaciones de expresión significativas a este pH (Fig. 21a). En condiciones neutras (LZM pH 7.0), no se observaron diferencias de expresión de los genes medidos, excepto UmZRT2, que presentó una represión de

más de 1000 veces en comparación con el calibrador. Este resultado reveló el papel potencial de Rim101p como activador de la expresión de UmZRT2 también a pH neutro (Fig. 21b).

a. Expresión génica a pH 4.0 en BMA2



b. Expresión génica a pH 7.0 en BMA2

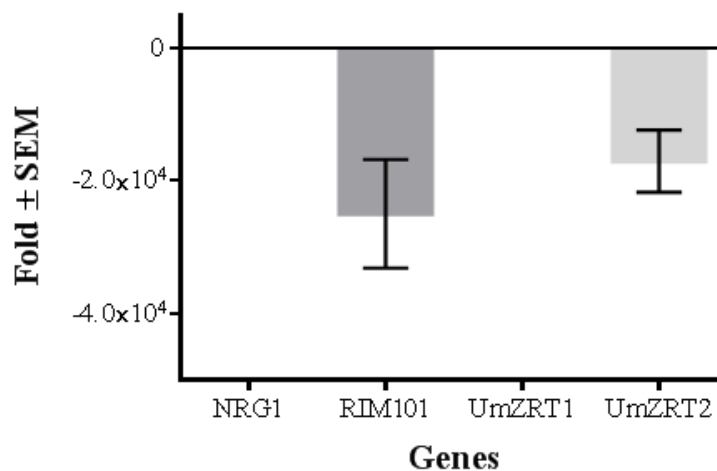


Figura 21. Expresión relativa de genes de BMA2 a pH ácido y neutro. Cada barra representa la media del cambio de expresión (fold change) (por el método Livak) de mediciones por triplicado de dos experimentos biológicos correspondientes a cada gen en FB1 (calibrador) y BMA2 (Δ RIM101). El fold change del control es 1 como una constante y los datos del control se incorporan en el fold change de los genes de interés. a) Diferencias en los cambios de expresión a pH 4.0 y bajas concentraciones de zinc en BMA2 en comparación con FB1. Se muestra el efecto de represión de Rim101p en UmZRT2. b) Diferencias en el cambio de expresión a pH 7.0 y bajas concentraciones de zinc de BMA2. Se exhibe el efecto activador de Rim101p sobre FB1, ya que BMA2 muestra más de 1000 veces de represión en esta condición.

7.8 Determinación de la regulación genética mediada por Rim101 en pH ácido.

Para evaluar la regulación de Rim101p en medio ácido se determinaron y analizaron los niveles de expresión relativa de los genes enlistados en la tabla S4 tal como se describió en Materiales y Métodos. Los genes usados como referencia presentaron niveles de expresión constantes en todas las muestras. El calibrador usado fue FB2 y después de la normalización el fold change del control fue 1 como constante. Finalmente, los datos de los controles fueron incorporados en el fold change de los genes de interés. Como se muestra en las figuras 22 y 23, la expresión de todos los genes estaba reprimida en la cepa BMA2 utilizando los genes de referencia 40s y 60s, lo que indica la sobre-expresión en la cepa silvestre FB2, lo que infiere actividad y regulación de los genes ensayados mediada por Rim101p en pH 3.

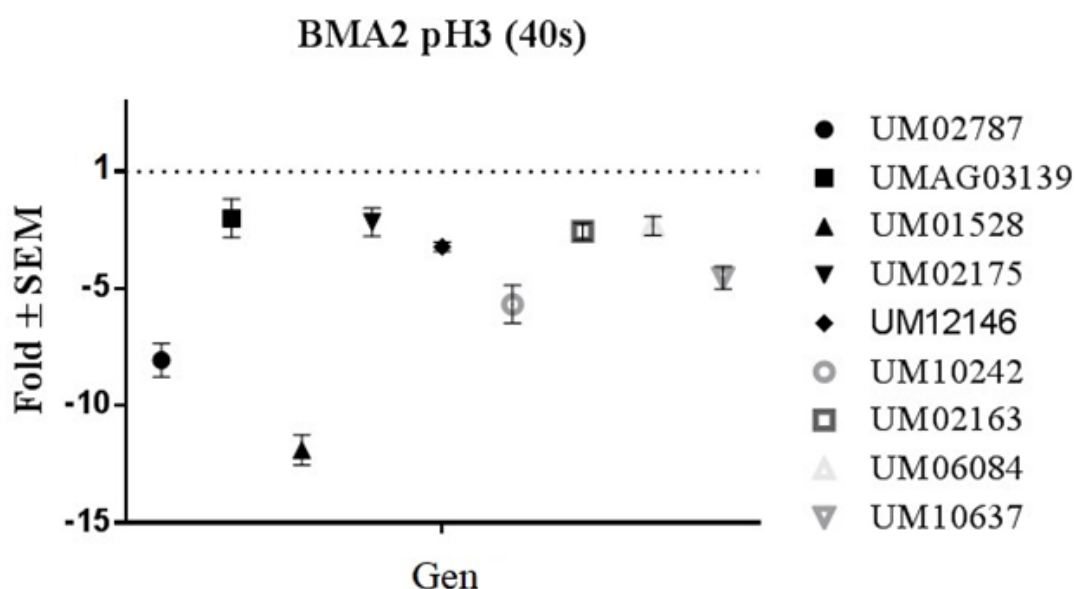


Figura 22. Expresión génica relativa de BMA2 en pH ácido usando como gen de referencia la subunidad ribosomal 40s. Cada barra representa el promedio del fold change (por el método Livak) de las mediciones por triplicado correspondientes a cada gen, en las cepas FB2 (calibrador) y BMA2 (Δ RIM101). El fold change del control fue 1 como constante y los datos de este fueron incorporados en el fold change de los genes de interés. Todos los genes mostraron represión en BMA2.

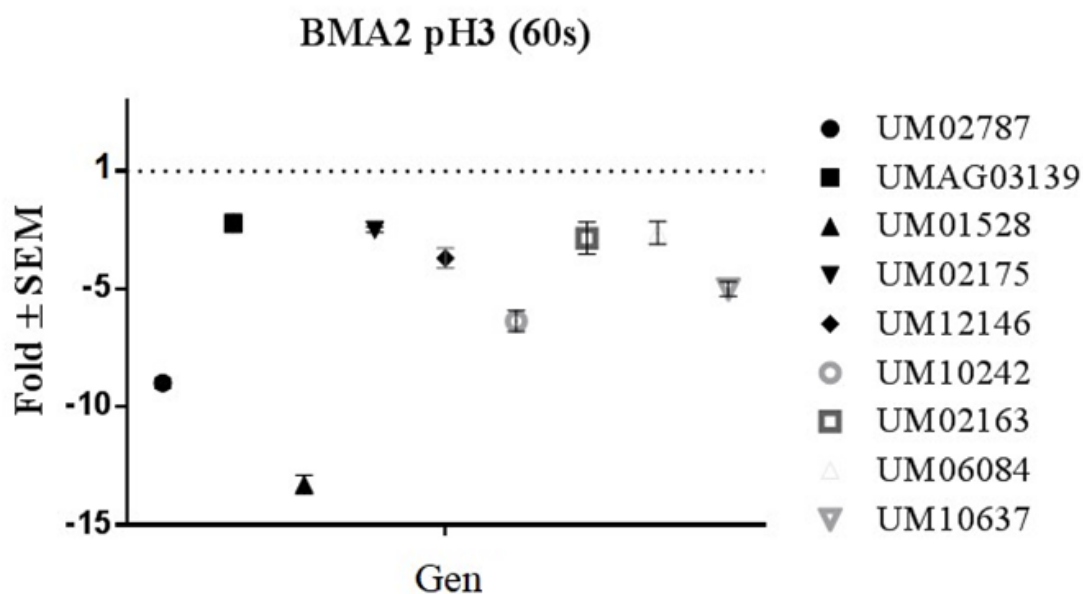
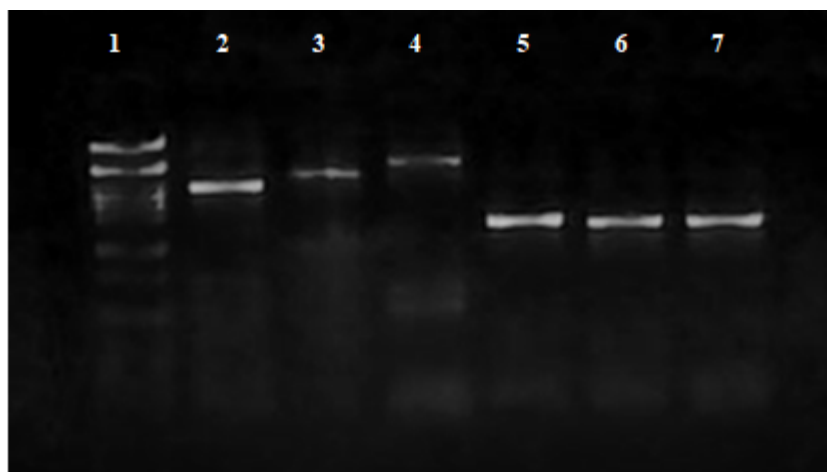


Figura 23. Expresión génica relativa de BMA2 en pH ácido usando como gen de referencia la subunidad ribosomal 60s. Cada barra representa el promedio del fold change (por el método Livak) de las mediciones por triplicado correspondientes a cada gen, en las cepas FB2 (calibrador) y BMA2 (Δ RIM101). El fold change del control fue 1 como constante y los datos de este fueron incorporados en el fold change de los genes de interés. Todos los genes mostraron represión en BMA2.

7.9 Localización celular de UmZrt1p, UmZrt2p y UmZapp en *Ustilago maydis*

7.9.1 Construcción de casetes de expresión y fusión con mCherry

Con el propósito de determinar la localización de las proteínas expresadas por los genes UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP, se procedió a diseñar casetes de expresión y fusión con mCherry tal como se describe en Materiales y Métodos. Los mapas, secuencias y oligonucleótidos generados se localizan en material suplementario. Durante el desarrollo de este estudio se logró estandarizar la amplificación de las regiones promotor-ORF y terminador de cada gen (Fig. 24). La finalización de los casetes se llevará a cabo en posteriores proyectos.



Región	Carril	Amplificación
Marca dor de peso molecular lambda-PstI	1	-
Promotor y ORF UmZRT1	2	2100 pb
Promotor y ORF UmZRT2	3	2724 pb
Promotor y ORF UmZAP	4	3548 pb
Terminador UmZRT1	5	1115 pb
Terminador UmZRT2	6	1057 pb
Terminador UmZAP	7	1049 pb

Figura 24. Estandarización de amplificación de fragmentos para casetes de expresión y fusión con mCherry. Se muestra la electroforesis de las amplificaciones de las regiones Promor-ORF y terminador de UmZRT1, UmZRT2 y UmZAP, usando los oligonucleótidos mostrados en la tabla S5 a una temperatura de 54°C.

7.10 Caracterización de la regulación del transporte de metales mediada por los factores de transcripción Rim101p y Nrg1p en diferentes pH.

Con el propósito de determinar principales efectos de la regulación por los factores de transcripción Rim101p y Nrg1p en el transporte de micro y macrominerales, se procedió a realizar la caracterización de las mutantes de los mismos, utilizando a la cepa silvestre FB2 como control, mediante la cuantificación de nutrientes en peso seco, por ICP-OES, después de permanecer en crecimiento en medio mínimo pH 3.0, 7.0 y 9.0, durante 14 horas. Cabe señalar que los resultados obtenidos, son resultados globales del efecto de los factores de transcripción, ya que estos pueden estar tanto regulando como reprimiendo genes en las diferentes condiciones, dando resultado la respuesta ante la situación dada.

Al cuantificarse la concentración de zinc en pH 3.0, se observaron niveles del mismo únicamente en FB2, mientras que en Δ RIM101 y Δ NRG1 no se detectaron niveles sensibles para el equipo, lo que demuestra la participación de estos factores de transcripción en la toma de zinc en esta condición. En pH 7.0 se observó mayor concentración del metal en Δ RIM101, lo que indica el papel represor global de Rim101p en la toma de zinc en pH neutro, mientras que Nrg1p muestra función activadora, ya que Δ NRG1 presentó bajos niveles del mineral. En pH 9.0, tanto Nrg1p como Rim101p parecen funcionar como represores de la toma de zinc ya que se mostraron concentraciones más elevadas del metal en ambas mutantes en comparación de la silvestre (Fig. 25).

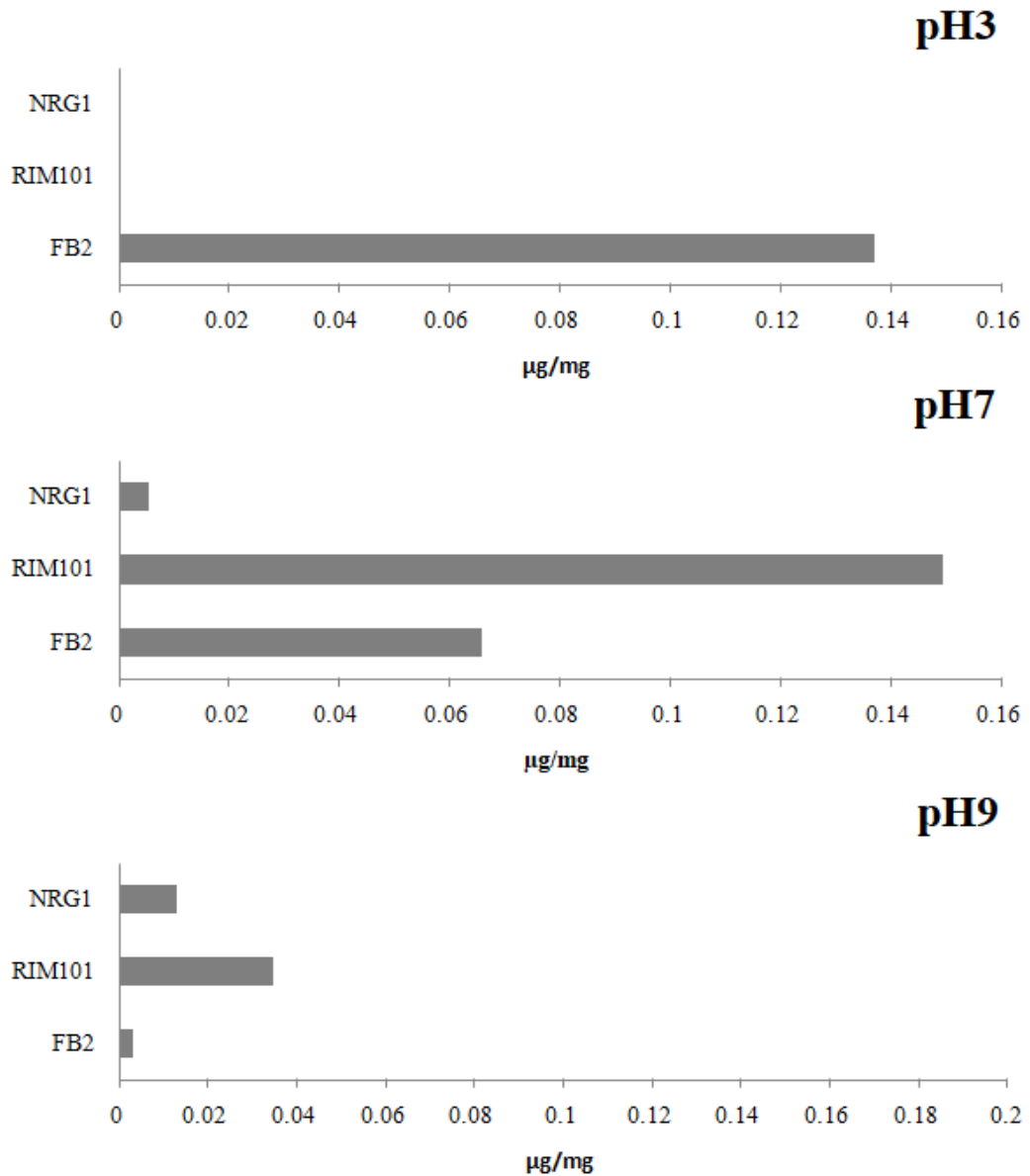


Figura 25. Cuantificación de zinc mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1. Determinación de la concentración de zinc en peso seco de células crecidas en medio mínimo a pH 3.0, 7.0 y 9.0.

Respecto a la cuantificación de hierro, en pH 7.0 se observó mayor concentración, seguido por la presentada en pH 9.0 y finalmente en pH3 en tercer lugar. Se presentó mayor afectación en el transporte de hierro tanto en la mutante de NRG1 como en la de RIM101, viéndose más afectada la primera, lo cual evidencia la función de estos factores de transcripción como reguladores del transporte del hierro en *Ustilago maydis* en pH 3.0, 7.0 y 9.0; mostrando su mayor inferencia en pH 7.0 y 9.0, seguido de pH3 (Fig. 26).

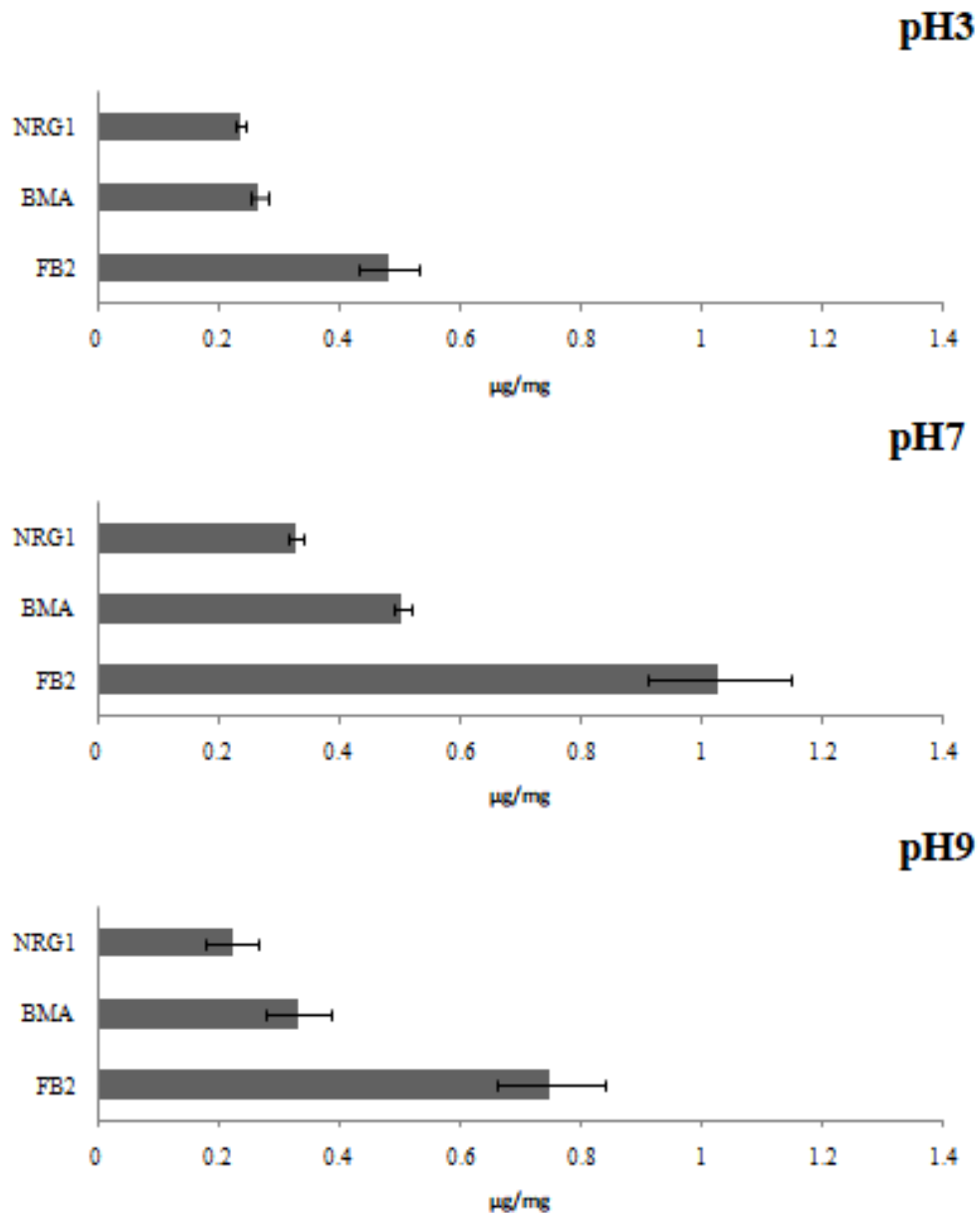


Figura 26. Cuantificación de hierro mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1. Determinación de la concentración de hierro en peso seco de células crecidas en medio mínimo a pH 3.0, 7.0 y 9.0.

En el caso del cobre, se cuantificó una mayor concentración en pH 7.0, en segundo lugar en pH 3.0 y en tercer lugar en pH 9.0. Se observó afectación en la toma de cobre por ambas mutantes, pero en un mayor grado en Δ NRG1 en comparación con Δ RIM101, por lo que se infiere que ambos factores de transcripción son importantes para la toma del metal, siendo Nrg1p el más involucrado en este proceso, en los 3 pH probados (Fig. 27).

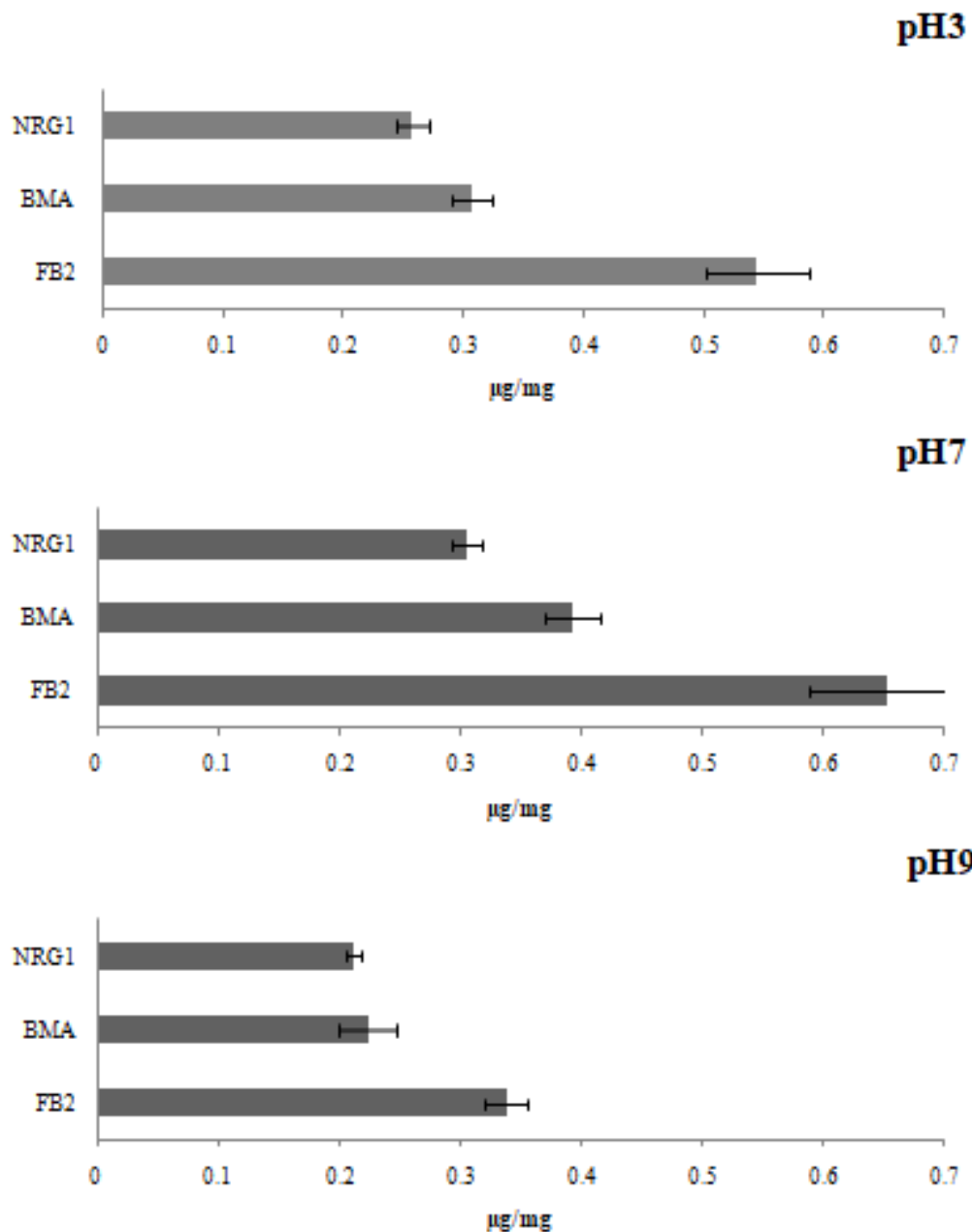


Figura 27. Cuantificación de cobre mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1. Determinación de la concentración de cobre en peso seco de células crecidas en medio mínimo a pH 3.0, 7.0 y 9.0.

En la cuantificación de potasio, se observaron concentraciones similares en FB2 en pH 3.0 y 7.0, viéndose mayor concentración en pH 7.0 que en pH 3.0 en las mutantes. Las menores concentraciones se observaron en pH 9.0 en comparación de los otros pH, presentándose en esta condición concentraciones similares entre las 3 cepas (tomando en cuenta el error estándar de la media). En pH 3.0, aunque se observó afectación en la toma de potasio en ambas mutantes, esta se presentó mayormente en Δ RIM101 y en pH 7.0 también se puede ver afectación en su toma,

pero con valores similares entre las mutantes. Con esto se prueba que tanto Rim101p como Nrg1p son necesarios para la toma de potasio en pH 7.0 en un grado similar, mientras que en pH 3.0 Rim101p presenta mayor participación en la toma del macromineral (Fig. 28).

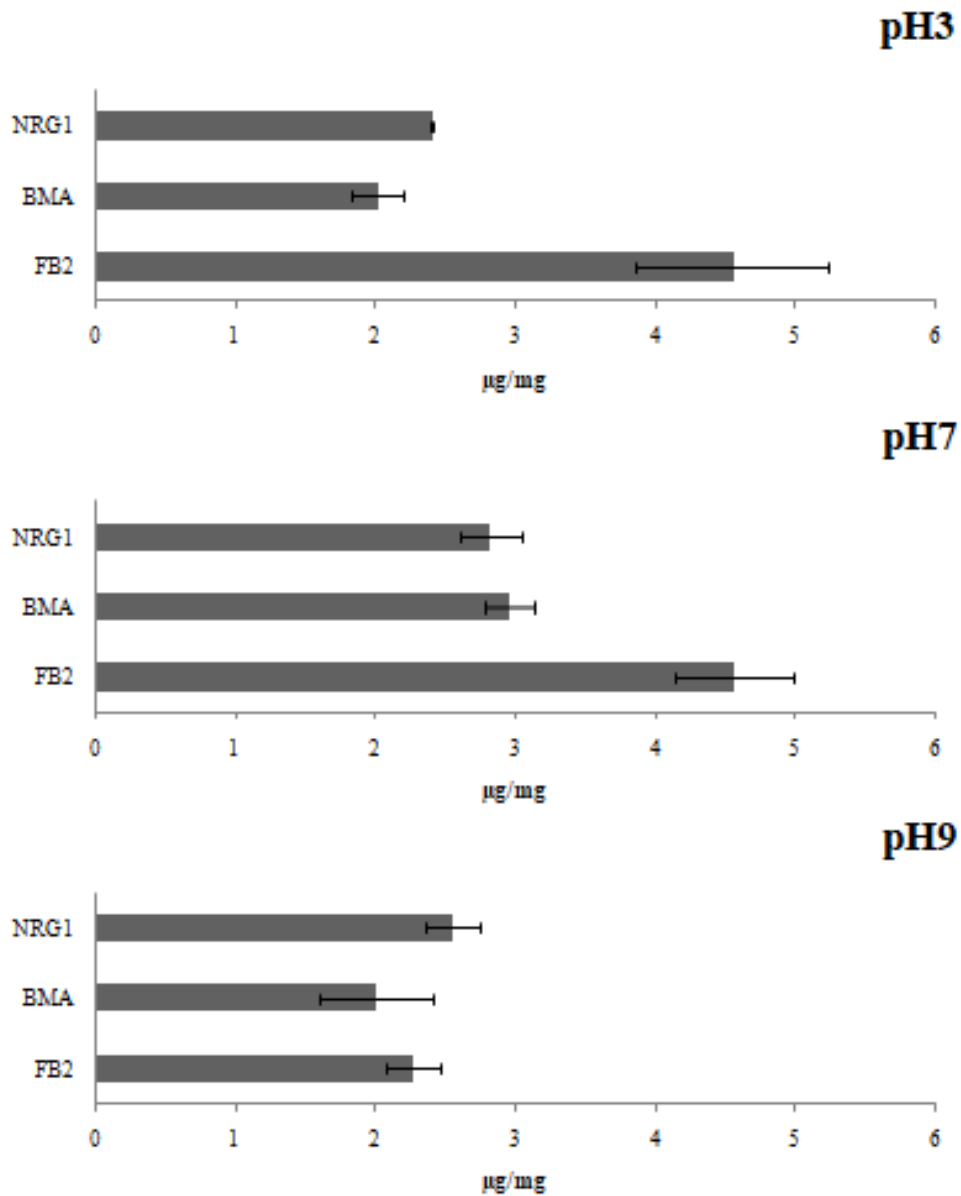


Figura 28. Cuantificación de potasio mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1. Determinación de la concentración de potasio en peso seco de células crecidas en medio mínimo a pH 3.0, 7.0 y 9.0.

Al realizar la cuantificación de sodio, se obtuvo una menor concentración en pH 9.0 y mayor en pH 7.0. La cantidad de sodio entre las 3 cepas en pH 3.0 fue muy similar, por lo que se infiere la participación de los factores de transcripción en la regulación de este mineral. En pH 7.0 Δ NRG1 presentó menor concentración de sodio, debido a esto, Nrg1p puede ser principalmente activador de la toma de este nutriente. En cambio, Rim101 presentó incluso mayor concentración que la cepa silvestre FB2, lo que infiere una función represora de Rim101p, en esta condición, para la toma de sodio (Fig. 29).

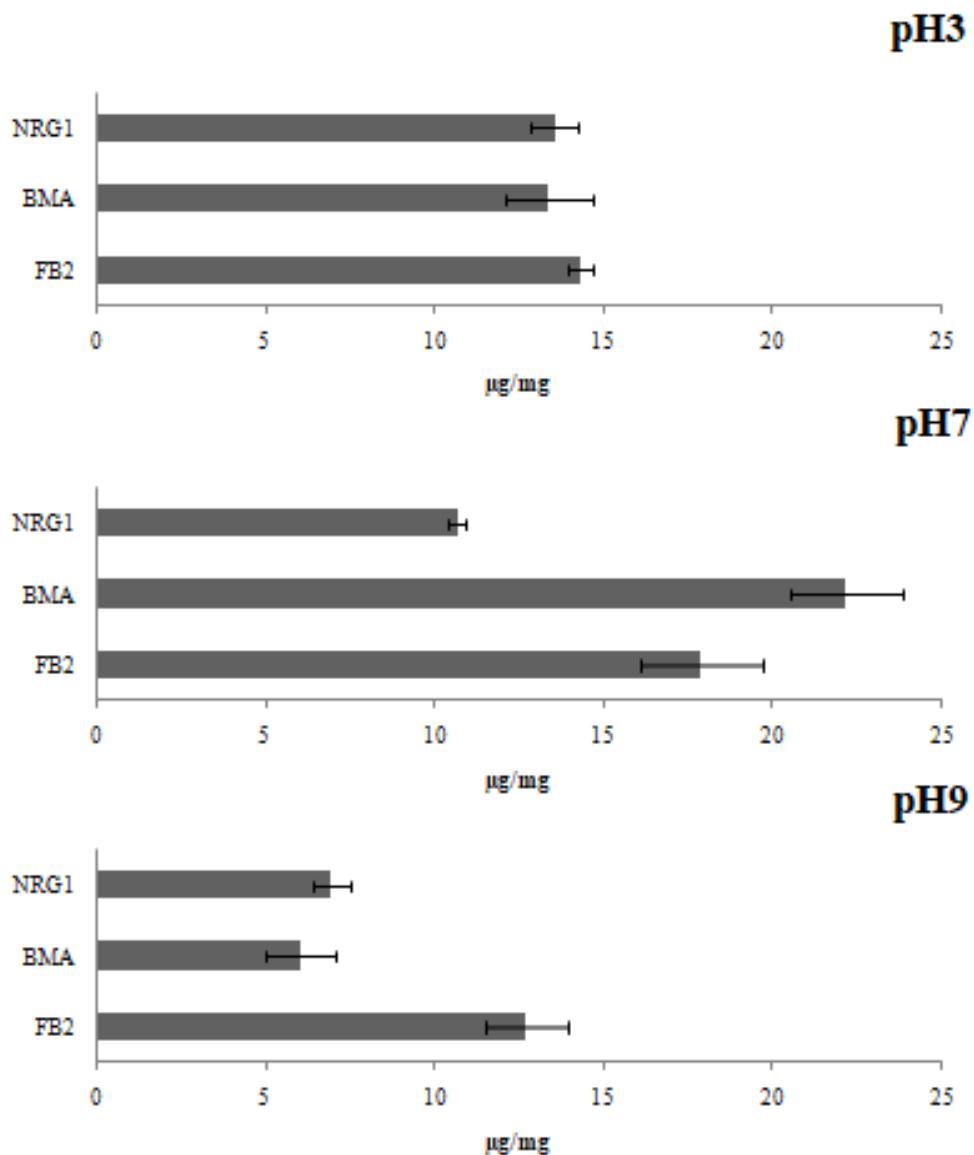


Figura 29. Cuantificación de sodio mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1. Determinación de la concentración de sodio en peso seco de células crecidas en medio mínimo a pH 3.0, 7.0 y 9.0.

Las cuantificaciones de magnesio mostraron que las mayores concentraciones del macromineral se presentaron en pH 3.0 y 7.0. En pH 3.0 se observó una mayor cantidad del nutriente en Δ NRG1, seguido por Δ RIM101 y en último lugar FB2, lo cual indica que en esta condición Nrg1p es un importante represor de la toma de magnesio, mientras que Rim101p también tiene efecto represor pero en menor grado. En pH 7.0 también se observa el efecto represor de Nrg1p en primer lugar, seguido por Rim101p, pero en menor grado en comparación con la condición de pH 3.0. Finalmente en pH 9.0 Nrg1p mostró también función represora, pero Rim101p, en este caso, se presentó como activador al indicar Δ RIM101 menor concentración que la cepa silvestre (Fig. 30).

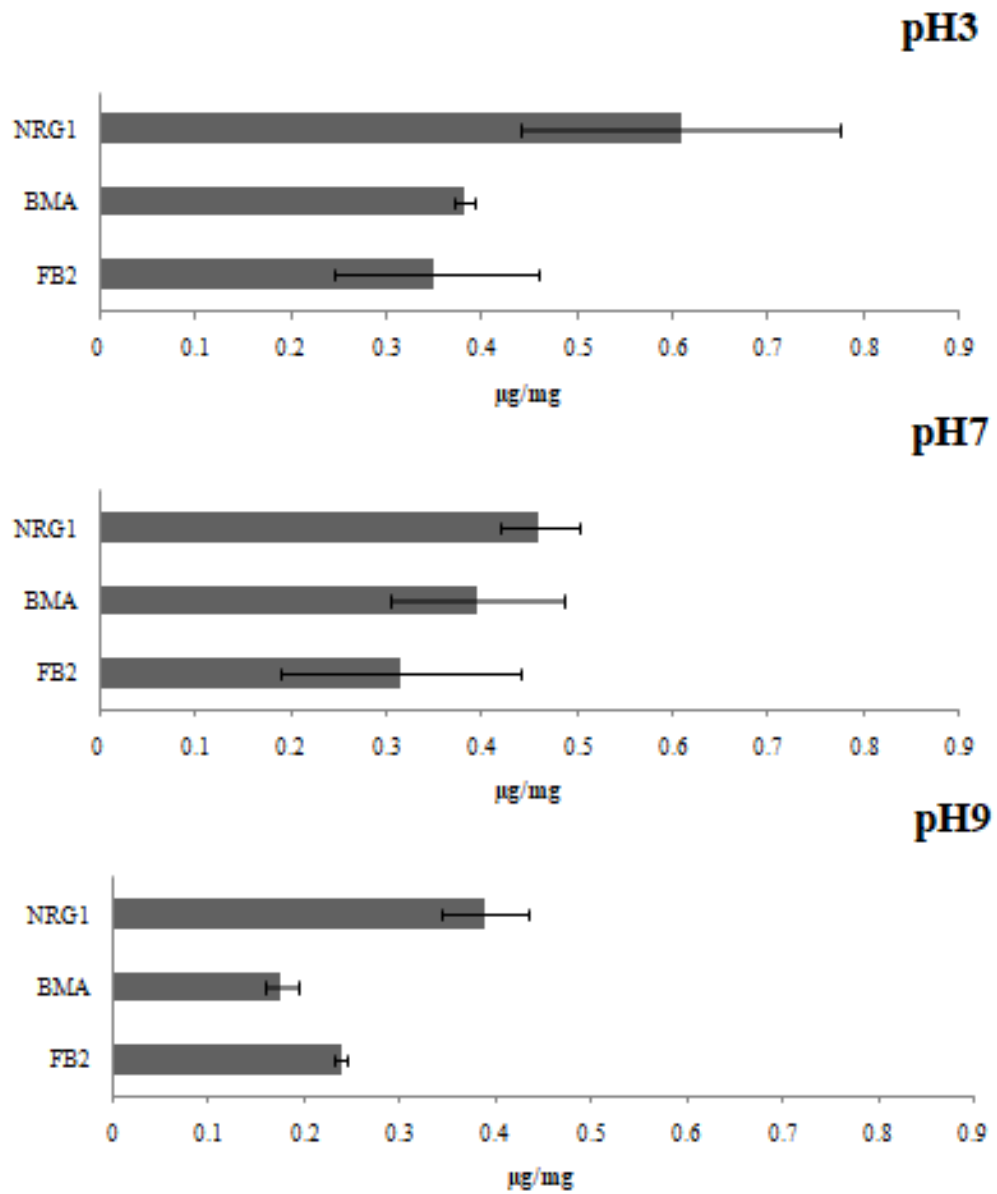


Figura 30. Cuantificación de magnesio mediante ICP-OES en las cepas FB2, BMA y NRG1. Determinación de la concentración de magnesio en peso seco de células crecidas en medio mínimo a pH 3.0, 7.0 y 9.0.

VIII. DISCUSIÓN

La homeostasis intracelular de iones es esencial para una fisiología estable de las células, por ello los organismos han desarrollado diferentes estrategias para lograr dicho equilibrio. Una estrategia comúnmente usada por los organismos a lo largo de diferentes filos es la expresión de transportadores con diferentes afinidades por iones para distribuirlos en el citoplasma, organelos o hacia el espacio extracelular. La familia de transportadores ZIP (Zrt/Irt-like proteins) fue identificada primero en plantas y sus miembros transportan varios metales, como lo son el cadmio, hierro, manganeso y/o zinc (Guerinot 2000), del espacio extracelular o del lumen organelar hacia el citoplasma (Balaji y Colvin 2005). Los transportadores ZIP han sido descritos en organismos pertenecientes a diversos filos (Gaither y Eide 2001; Eide 2005). Los miembros fundadores de la familia ZIP incluyen a las proteínas Zrt1p y Zrt2p (Zinc-regulated transporters) en *S. cerevisiae*, las cuales han sido bien caracterizadas en esta levadura (Zhao y Eide 1996a, 1996b). También, han sido reportados ortólogos de ZIP en otras divisiones, pero principalmente en otros Ascomicetos, como *A. fumigatus* (ZrfA y ZrfB) (Amich et al. 2010). Sin embargo, el estudio de ortólogos ZIP en Basidiomicetos permanece escaso (Wilson et al. 2012).

En este trabajo, fueron identificados por similitud aminoacídica dos sistemas de toma de Zn^{+2} que corresponden a los números de acceso MF177953 (Um00096/UmZRT1) y MF177954 (um03110/UmZRT2) y un gen con probable función reguladora de la expresión, tipo factor de transcripción UmZAP (Um00264) en el hongo basidiomiceto *U. maydis*, cabe señalar que no se encontró algún gen tipo ZRT3 en este hongo. La similitud con los miembros de la familia ZIP, UmZrt1 y UmZrt2, fue evidente por la presencia de dominios ZIP en ambas proteínas. La mayoría de los transportadores ZIP presentan topologías similares, caracterizadas por la presencia de 8 dominios transmembranales, con los extremos N- y C-terminales localizados hacia fuera de la membrana plasmática (Nishida et al. 2008). Las proteínas ZIP pueden variar en rango de longitud; las principales diferencias en tamaño se encuentran localizadas entre los dominios III y IV (espacio denominado "región variable"), la cual tiene un sitio potencial de unión a metal localizado en el citoplasma y en su extremo N-terminal (Guerinot 2000). En *U. maydis* encontramos mediante análisis *in silico* que de igual manera estas proteínas contienen ocho dominios transmembranales, localizados en la membrana plasmática con los

extremos N- y C-terminal orientados hacia el espacio extracelular y ambas contienen una extensa región variable entre los dominios mencionados anteriormente, en el espacio extracelular y una marcada diferencia en la longitud y contenido de aminoácidos en el extremo N-terminal. UmZRT1 codifica para una proteína de 362 aminoácidos y UmZRT2 para una de 506 aminoácidos. Las principales diferencias en longitud se deben principalmente a la variación característica en longitud y contenido aminoácido en los extremos N- terminales de las proteínas de la familia ZIP, en el caso de *U. maydis* UmZrt1p cuenta con 19 residuos a diferencia de los 184 aminoácidos que conforman el N-terminal de UmZrt2p (Buchan et al. 2013; The UniProt Consortium 2018).

Estudios de cinética en la toma de zinc por células de *S. cerevisiae* sometidas a diferentes concentraciones de sustrato en el medio han sugerido las distintas funcionalidades de los dos principales transportadores de zinc; Zrt1p tiene alta afinidad por Zn^{+2} y está únicamente activo en células limitadas de zinc (Zhao y Eide 1996a) y Zrt2p tiene un sistema de baja afinidad por la toma de zinc y es más activo en células repletas de zinc (Zhao y Eide 1996b). Nuestros análisis de complementación sugieren que el gen UmZRT1 es ortólogo al ZRT1 de *S. cerevisiae*, ya que fue capaz de restablecer el transporte de zinc en la cepa ZHY3 ($\Delta zrt1 \Delta zrt2$) ante bajas concentraciones de $ZnCl_2$. Además, el crecimiento de la cepa $\Delta UmZRT1$ fue severamente afectado ante bajas concentraciones de Zn. Adicionalmente, encontramos que el gen UmZRT2 codifica para un transportador cuya afinidad por zinc aparenta ser menos que la de UmZRT1, debido a que la complementación sólo fue observada en altas concentraciones de zinc (1000 μM $ZnCl_2$) y el crecimiento de $\Delta UmZRT2$ fue menos afectado en las diferentes concentraciones de zinc probadas. Así, UmZrt2 es ortólogo al transportador de baja afinidad Zrt2 de *S. cerevisiae*. El contenido intracelular de zinc fue medido mediante ICP-OES después del crecimiento ante concentraciones en incremento de $ZnCl_2$ en la cepa silvestre de *U. maydis*, $\Delta UmZRT1$ y $\Delta UmZRT2$. Con dichos resultados se apoya la hipótesis del alta y baja afinidad por zinc de UmZrt1 y UmZrt2 respectivamente. Notablemente, no se observaron variaciones en el contenido de otros metales comúnmente transportados por los miembros ZIP (ej. hierro y manganeso), así que estas proteínas no parecen estar involucradas en su transporte.

En todos los organismos, la toma de zinc está controlada para asegurar niveles óptimos del metal, mientras que se previene su sobre-acumulación potencialmente tóxica. La toma de zinc en *S. cerevisiae* está controlada a nivel transcripcional en respuesta a las concentraciones intracelulares de zinc (Zhao y Eide 1996a, 1996b) y la regulación de estos genes es mediada por el factor de transcripción Zap1, que tiene uno de los dominios clásicos de los factores de transcripción de dedos de zinc (ZnF1-ZnF7), formando los cinco más próximos al extremo carboxilo (ZnF3-ZnF7) que conforman el dominio de unión a ADN (Amich 2010). En este estudio se logró identificar a la proteína que denominamos UmZapp mediante análisis *in silico* y presenta porcentaje de identidad de 42.26 con Zapp de *S. cerevisiae*, tal como se muestra en la figura 6, UmZapp también exhibe 5 dedos de zinc en el extremo próximo al carboxilo, los que potencialmente pudieran ser los equivalentes a ZnF3-ZnF7 y varios sitios de unión a zinc al igual que ZAP. Por lo que se realizaron importantes avances en la generación de la mutante de UmZAP para su posterior caracterización en *U. maydis*. Un punto a destacar es que ZAP en *S. cerevisiae* responde a las concentraciones de zinc, independientemente de pH ambiental (Zhao y Eide 1997), sin embargo, hay otros factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los transportadores ZIP en *Aspergillus fumigatus* incluido PacC/Rim101 que responde a cambios de pH. ZRFA y ZRFB (ortólogos de ZRT1 y ZRT2) en este hongo son requeridos para el crecimiento en condiciones ácidas y limitantes de zinc, pero son dispensables en medios neutros o alcalinos limitantes del metal, siendo reprimidos por el regulador transcripcional PacC/Rim101p (Amich 2010). En *Ustilago maydis* encontramos que UmZRT1 y UmZRT2 fueron expresados en medios ácidos y neutros limitantes de zinc. A pH 4.0 los niveles de expresión de UmZRT1 y NRG1 no presentaron variaciones considerables entre FB2 Y BMA2 (Δ RIM101) en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, UmZRT1 no parece ser regulado por Rim101p. En contraste, UmZRT2 mostró un incremento de ~800-fold de expresión en BMA2 (Fig. 21a), así que su expresión parece ser regulada por Rim101p, como represor de UmZRT2 en pH ácido y ante bajas concentraciones de zinc en la cepa silvestre FB2, directa o indirectamente por la activación de otros reguladores de la expresión en esta condición específica.

Esta observación sugiere que puede haber una forma activa de PacC/Rim101p capaz de regular sus genes diana no sólo ante ambientes neutros/alcalinos, si no que también bajo condiciones ácidas. Para reforzar la actividad reguladora de Rim101 en ambientes ácidos, se demostró su participación en la regulación de 9 genes más en pH 3.0 mediante la cuantificación relativa de la expresión de estos. Rim101p puede regular la expresión de manera directa o indirecta y se ha reportado que tiene función en ambientes ácidos, de manera indirecta al reprimir la expresión de NRG1, el cual tiene acción represora y al ser reprimido activa genes en pH ácido en *S. cerevisiae* (Lamb and Mitchel 2003;Peñalva et al. 2008). Para corroborar la participación de Rim101p y de Nrg1p en la regulación del transporte de micro y macronutrientes, se determinó la composición elemental de estos por ICP-OES de las mutantes BMA y FMA (Δ RIM101 y Δ NRG1) usando como control a la cepa FB2, en pH 3.0, 7.0 y 9.0. En todas las condiciones analizadas se observó que Rim101p y Nrg1p tienen inferencia en la obtención de Zn^{+2} , Fe, Cu, K, Na, Mg, ya sea reprimiendo o activando genes involucrados en la expresión de proteínas transportadoras de dichos macro y microminerales. Esto representa evidencia adicional que demuestra que existe actividad de PacC/Rim101p ante pH ácido y refuerza datos previos acerca de la deposición de septos observada en pH ácido en mutantes de RIM101 en *U. maydis* (Aréchiga and Ruiz-Herrera 2005). Adicionalmente, una probable actividad de PacCp bajo condiciones ácidas fue reportada en *Trichoderma viridens* (Trushina et al. 2013).

El zinc es un metal esencial para la fisiología celular y mientras que algunos estudios de la homeostasis de zinc están disponibles en basidiomicetos, nuestros datos proveen información para futuros estudios de homeostasis de zinc y otros metales en modelos fúngicos no tradicionales. Nuestros resultados también identifican a un potencial regulador de la expresión como lo es Rim101p actuando en condiciones no canónicas ante pH ácido. Más estudios son requeridos para evaluar si nuestras observaciones pueden ser extrapoladas para otros miembros del filo.

IX. CONCLUSIONES

- Los genes um00096 (UmZRT1) y um03110 (UmZRT2) codifican para transportadores de zinc.
- umZRT1 es un transportador de alta afinidad por zinc y umZRT2 de baja afinidad en *Ustilago maydis*.
- El gen umZRT1 se expresa ante concentraciones bajas de zinc, independientemente del pH ácido o neutro del medio. El gen umZRT2 se reprime en ambientes con pH ácido y se sobreexpresa en ambientes con pH neutro.
- El gen umZRT1 no es regulado por Rim101p en pH ácido y en neutro, mientras que umZRT2 es regulado directa o indirectamente por el factor de transcripción.
- El gen um00264 (UmZAP) en *Ustilago maydis* es potencialmente un factor de transcripción tipo ZAP en *S. cerevisiae*.

X.PERSPECTIVAS

- Continuar con la búsqueda de un transportador vacuolar tipo Zrt3p en *Ustilago maydis*, con la caracterización de la mutante de UmZAP y la localización celular de las proteínas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adiloglu A, Adiloglu S. 2006. The effect of boron (B) application on the growth and nutrient contents of maize in zinc (Zn) deficient soils. *Res. J. Agric. Bio. Sci.* 2(1):1-4.
- Agrios, GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. USA, pp. 922.
- Alloway BJ. 2004. *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. International Zinc Association Communications. IZA publications, Brussels, Belgium.
- Alloway BJ. 2008. *Zinc in soils and crop nutrition*. 2nd ed., International Zinc Association (IZA) and International Fertilizer Association (IFA), Brussels, Belgium and Paris, France. p. 20,139.
- Alloway BJ. 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ Geochem Health*. 31(5): 537-548.
- Almagro Armenteros JJ, Sønderby CK, Sønderby SK, Nielsen H, Winther O. 2017. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*. 33(21): 3387-3395.
- Amich J. 2010. Homeostasis del zinc a pH alcalino y su relevancia en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*. [Zinc homeostasis at alkaline pH and its relevance in *Aspergillus fumigatus* virulence], [dissertation]. Universidad de Salamanca, España.
- Amich J, Leal F, Calera JA. 2009. Repression of the acid ZrfA/ZrfB zinc-uptake system of *Aspergillus fumigatus* mediated by PacC under neutral, zinc-limiting conditions. *Int. Microbiol.* 12(1): 39–47.
- Amich J, Vicente-franqueira R, Mellado E, Ruiz-Carmuega A, Leal F, Calera J. 2014. The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. *Cell Microbiol.* 16(4):548-64.
- Auld D. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*. Sep-Dec; 14(3-4):271-313.

- Aréchiga ET, Ruiz-Herrera J. 2005. The RIM101/PacC homologue from the Basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell*. 4(6): 999–1008.
- Balaji RV, Colvin RA. 2005. A proton-dependent zinc uptake in PC12 cells. *Neuro chem Res*. 30(2): 171–176.
- Banuet F, Herkowitz I. 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(15): 5878-5882.
- Barret A, Cantor C, Liebecq C, Moss G, Saenger W, Sharon N, Tipton K, Venetianer P, Vliegthart G. 1992. Enzyme nomenclature. Academic Press, New York, pp. 5-22.
- Baslam M, Qaddoury A, Goicoechea N. 2014. Role of native and exotic mycorrhizal symbiosis to develop morphological, physiological and biochemical responses coping with water drought of date palm, *Phoenix dactylifera*. *Trees*. 28(1): 161–172.
- Barker A, Pilbeam D. 2015. Handbook of plant nutrition. CRC press.
- Biesalski, HK. 2013. Hidden Hunger. Springer, pp. 25-50.
- Bird A, Blankman E, Stillman D, Eide D, Winge R. 2004. The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2. *EMBO J*. 23(5):1123–1132.
- Bird A, Swierczek S, Qiao W, Eide D, Winge D. 2006. Zinc metalloregulation of the zinc finger pair domain. *J. Biol. Chem*. 281, 25326–25335.
- Bird A, Zhao H, Luo H., Jensen L, Srinivasan C, Evans-Galea M, Winge D, Eide D. 2000. A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator *EMBO J*. 19, 3704–3713.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979 Nov

- 24;7(6):1513-23. Bölker M. 2001. *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395–1401.
- Bonfante P. 2001. At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In *Fungal associations*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 45-61.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14(2):115–132.
- Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R. 2009. *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:423–445.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007. Zinc in plants. *The New Phytologist* 173 (4):677–702.
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F. 2012. Function of nutrients: micronutrients. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, 2012. 191-248.
- Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K, Jones DT. 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic acids res.* 41(W1), W349-W357.
- Burdette S, Walkup G, Spingler B, Tsien R, Lippard S. 2001. Fluorescent sensors for Zn⁽²⁺⁾ based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution, *J. Am. Chem. Soc.* 123:7831–7841.
- Burleigh SH, Kristensen BK, Bechmann IE. 2003. A plasma membrane zinc transporter from *Medicago truncatula* is up-regulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization. *Plant Mol Biol* 52:1077–1088

Cakmak I, Pfeiffer W, McClafferty B. 2010. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chem.* 87(1):10-20.

Cakmak I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification?. *Plant and soil* 302.1-2 (2008): 1-17.

Cakmak I. 2011. Zinc plays critical role in plant growth. Available: http://www.zinc.org/crops/resourceserve/zinc_plays_critical_role_in_plant_growth.

Cario E, Jung S, Harder D'Heureuse J, Schulte C, Sturm A, Wiedenmann B, Goebell H, Dignass AU. 2000. Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro. *Eur J Clin Invest*, 30(5):419–428.

Catlett NL, Lee BN, Yoder OC, Turgeon BG. 2003. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genet Rep.* 50(1): 9-11.

Cavagnaro TR. 2008. The role of arbuscular mycorrhizas in improving plant zinc nutrition under low soil zinc concentrations: a review. *Plant and Soil.* 304(1-2): 315–325.

Cediel G, Olivares M, Brito A, Cori H, López de Romaña D. 2015. Zinc deficiency in Latin America and the Caribbean. *Food and nutrition bulletin*, 36(2_suppl), S129-S138.

Chao Y, Fu D. 2004. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB, *J. Biol. Chem* 279:12043–12050.

Chavan S, Smith SM. 2014. A rapid and efficient method for assessing pathogenicity of *Ustilago maydis* on maize and teosinte lines. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (83), e50712.

Christie P, Li XL, Chen BD. 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant Soil* 261:209–217.

Cimmyt, International Centre for Wheat and Maize Improvement. 2011. www.cimmyt.org?research/wheat/map/developing_world/wheat_developing_world.

de Mattos-ShipleY KM, Ford KL, Alberti F, Banks AM, Bailey AM, Foster GD. 2016. The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. *Stud mycol.* 85: 125–157.

Coleman J. 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annual Review of Biochemistry.* 61:897-946.

Colvin R, Davis N, Nipper R, Carter P. 2000 Evidence for a zinc/proton antiporter in rat brain. *Neurochem Int* 36: 539-547.

Conklin D, Culbertson M, Kung C. 1994. Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 244: 303–311.

Coyle P, Zalewski P, Philcox J, Forbes I, Ward A, Lincoln S, Mahadevan, I, Rofe A. 1994. Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc, *Biochem. J.* 303:781–786.

Dehn B, SchüepP H. 1989. Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29, 79–83

Devirgiliis C, Murgia C, Danscher G, Perozzi G. 2004. Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323:58–64.

Eide D. 2003. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* 133: 1532S-1535S.

Eide D. 2004. The SLC39 family of metal ion transporters, *Pflugers Arch.* 447: 796–800.

Eide D. 2005. The Zip family of zinc transporters. *Molecular Biology Intelligence Unit.* p. 261-264.

- Eide D. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *BiochimBiophys.* 1763(7): 711-722.
- Eide D. 2009. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284: 18565-18569.
- Ellis C, Wang F, MacDiarmid C, Clark S, Lyons T, Eide D. 2004. Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function, *J. Cell Biol.* 166 (2004) 325–335.
- Ellis C, MacDiarmid C, Eide D. 2005. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 280, 28811–28818.
- Fairhead C, Llorente B, Denis F, Soler M, Dujon B. 1996. New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using ‘split-marker’ recombination. *Yeast.* 12(14): 1439–1457.
- Fairhead C, Thierry A, Denis F, Eck M, Dujon B. 1998. Mass-murder'of ORFs from three regions of chromosome XI from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 223(1-2): 33-46.
- Figueiredo DD, Barros PM, Cordeiro AM, Serra TS, Lourenço T, Chander S, Oliveira MM, Saibo NJM. 2012. Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene OsDREB1B. *J Exp Bot.* 63(10): 3643-56.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, et al. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42(D1): D222-D230.
- Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Kambe T. 2009. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 30798–30806.
- Gaither L, Eide D. 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation, *BioMetals.* 14(3-4): 251–270.

- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SSDNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355±360.
- Gitan R, Eide D. 2000. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* 346, 329–336.
- Gitan R, Lou H, Rodgers J, Broderius M, Eide D. 1998. Zinc induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* 273, 28617–28624.
- Gonçalves Júnior AC, Nacke H, Marengoni NG, Carvalho EAD, Coelho GF. 2010. Yield and production components of soybean fertilized with different doses of phosphorus, potassium and zinc. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(3), 660-666.
- Gregory D, Martin A, Cheetham J, Rees A. 1993. The prediction and characterization of metal binding sites in proteins. *Prot. Eng.* 6:29–35.
- Guerinot ML. 2000. The ZIP family of metal transporters. *BiochimBiophys Acta.* 1465:190-198.
- Guerra, S. 2005. Caracterización bioquímica de la H⁺ATPasa de membrana plasmática de *Ustilago maydis* en la forma micelial en condiciones de estrés nutricional. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Oaxaca, México.
- Hafeez B, Khanif YM, Saleem M. 2013. Role of zinc in plant nutrition-a review. *Journal of Experimental Agriculture International* (2013): 374-391.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hamer DH. 1986. Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55, 913–951.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166,557-580.

- Harrison MJ. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59 19–42.
- Heinonsalo J, Buée M, Vaario LM. 2017. Root-endophytic fungi cause morphological and functional differences in Scots pine roots in contrast to ectomycorrhizal fungi. *Botany*, 95(2), 203-210.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young, JPW. 1998. Ploughing up the wood-wide web?. *Nature*, 394(6692), 431-431.
- Herbig A, Bird A, Swierczek S, McCall K, Mooney M, Wu C, Winge D, Eide D. 2005. Zap1 activation domain 1 and its role in controlling gene expression in response to cellular zinc status. *Mol Microbiol* 57: 834-846.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2006. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem* 68:139–146.
- Ho L, Ratnaike R, Zalewski P. 2000. Involvement of intracellular labile zinc in suppression of DEVD-caspase activity in human neuroblastoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:148–154.
- Hofmann K, Stoffel W. 1993. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 374,166.
- Holliday R. 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet Res.* 2(2):231-248.
- Hotz C, Brown KH. 2004. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull.* 25(1): 94-204.
- ILZRO. 1975. Zinc in Crop Nutrition, International Lead Zinc Research Organisation Inc, Research Triangle Park
- Institute of Medicine (U.S.). 2001. DRI: Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: National Academy Press.

- Iwata M, Takebayashi T, Ohta H, Alcalde RE, Itano Y, Matsumura T. 1999. Zinc accumulation and metallothionein gene expression in the proliferating epidermis during wound healing in mouse skin. *Histochem Cell Biol*, 112(4):283–290.
- James T, Kauff F, Schoch C, Matheny P, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 19; 443(7113):818-22.
- Jensen L, Ajua-Alemanji M, Culotta V. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis, *J. Biol. Chem.* 278:42036–42040.
- Jin W, Peng L, Zhang X, Sun H, Yuan Z. 2019. Effects of Endophytic and Ectomycorrhizal Basidiomycetes on *Quercus virginiana* Seedling Growth and Nutrient Absorption. *Journal of Sustainable Forestry*, pp. 1-14.
- Jones P, Binns D, Chang H, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn A, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, Jan 2014.
- Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 219:161–167.
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, et al. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 44(7115): 97-101.
- King JC. 2006. Modern Nutrition in Health and Disease. Zinc In: Shils, ME. Shike, M. Editors. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 271-285.
- Klosterman S.J. 2007. Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics* 57: 1-24.

- Koh J, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. 1996. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272, 1013–1016.
- Kramer U, Clemens S. 2005. Function and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. *Topics Curr Genet.* 14: 215- 271.
- Kumanovics A, Poruk K, Osborn K, Ward D, Kaplan J. 2006. *YKE4* (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 22566-22574.
- Lamb T, Mitchell AP. 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 23(2): 677–686.
- Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP. 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem.* 276:1850-1856
- Leon L, Lopes A, Vlek P. 1985. Micronutrient problems in tropical Latin America. In: Vlek, P. (ed). *Micronutrients in Tropical Food Crop Production*. Martinus Nijhoff/Dr W/ Junk Publishers, Dordrecht, pp. 95-130.
- León C, Sánchez J, Ruiz-Herrera J. 2014. *Ustilago maydis*, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. *Natural Resources*, 5:256-267.
- Li, SC, Kane, PM. 2009. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 650–663.
- Li L, Kaplan J. 1998. Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* 273, 22181–22187.
- Li L, Kaplan J. 2000. The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc, *J. Biol. Chem.* 276:5036–5043.

- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Lyons T, Gasch A, Gaither L, Botstein D, Brown P, Eide D. 2000. Genome wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7957-7962.
- Ma J, Ueno D, Zhao F, McGrath S. 2005. Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*, *Planta* 220:731–736.
- MacDiarmid C, Gaither L, Eide D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19(12):2845–2855.
- MacDiarmid C, Milanick M, Eide D. 2002. Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 277:39187–39194.
- MacDiarmid C, Milanick M, Eide D. 2003. Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock, *J. Biol. Chem.* 278: 15065–15072
- McCall K, Huang C, Fierke C. 2000. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *Zinc and Health: Current Status and Future Directions. Journal of nutrition*, vol. 130 no. 5 1437S-1446S.
- Maqbool M, Beshir A. 2019. Zinc biofortification of maize (*Zea mays* L.): Status and challenges. *Plant breeding*, 138(1), 1-28.
- Maret W, Chem L. 2009. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chemical Reviews*. 109:4682–4707.

Maret W, Sandstead H. 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 20, 3–18.

Maret W, Yetman C, Jiang L. 2001. Enzyme regulation by reversible zinc inhibition: glycerol phosphate dehydrogenase as an example. *Chem Biol Interact*, 130-132: 891-901.

Martínez-Espinoza A, García-Pedrejas M, Gold S. 2002. The Ustilaginales as Plant pests and Model Systems. *Fungal Genetics and Biology* 35: 1-20.

Mayorga ME, Gold SE. 1998. Characterization and Molecular Genetic Complementation of Mutants Affecting Dimorphism in the Fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 24(3), 364-376.

Mejía-Rodríguez F, Shamah-Levy T, Villalpando S, García-Guerra A, Méndez-Gómez Humarán I. 2013. Iron, zinc, copper and magnesium deficiencies in Mexican adults from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex* 2013;55:275–84.

Mendoza-Cózatl DG, Xie Q, Akmakjian GZ, Jobe TO, Patel A, Stacey MG, Song L, Demoin DW, Jurisson SS, Stacey G, et al. 2014. OPT3 is a component of the iron-signaling network between leaves and roots and misregulation of OPT3 leads to an over-accumulation of cadmium in seeds. *Mol plant*, 7(9): 1455-1469.

Mewes HW, Amid C, Arnold R, Frishman D, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Pagel P, Strack N, Stümpflen J, et al. 2004. MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* Jan 1; 32 Database issue: D41-4.

Michalczyk A, Allen J, Blomeley R, Ackland M. 2002. Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells, *Biochem. J.* 364:105–113

Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics* 8: 107.

Morales M, Villalpando S, García A, Shamah T, Robledo R, Avila M, Rivera J. 2012. Iron, zinc, copper and magnesium nutritional status in Mexican children aged 1 to 11 years. *Salud Publica Mex* 2012;54:125–34.

Nasir M, Fahrni C, Suhy D, Kolodsick K, Singer C, O'Halloran T, 1999. The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc–quinolinesulfonamide complex, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4:775–783.

NCBI Resource Coordinators. 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 44 (Database issue): D7–D19.

Nishida S, Mizuno T, Obata H. 2008. Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. *Plant Physiol. Biochem.*46(5-6): 601–606.

Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershinkel M, Sekler I. 2009. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem* 284: 17677-17686.

Ojeda-Barrios D, Abadía J, Lombardini L, Abadía A, Vázquez S. 2012. Zinc deficiency in field-grown pecan trees: changes in leaf nutrient concentrations and structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1672-1678.

Ojeda-Barrios DL, Perea-Portillo E, Hernández-Rodríguez OA, Avila-Quezada G, Abadía J, Lombardini L. 2014. Foliar fertilization with zinc in pecan trees. *HortScience*, 49(5), 562-566.

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*. Mar 15; 30(6): 884-6.

- Outten C, O'Halloran T. 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis, *Science* 292: 2488–2492.
- Palmiter R, Cole T, Findley S. 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration, *EMBO J.* 15:1784–1791.
- Palmiter R, Findley S. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *EMBO J.* 14: 639–649.
- Palmiter R, Huang L. 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch.* 447: 744–751.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews Microbiology*, 6: 763 – 775.
- Patton C. 1994. Maxchelator computer program. Pacific Grove.
- Paulsen I, Saier M. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.*, 156, 99–103.
- Peay KG, Kennedy PG, Talbot JM. 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 434-447.
- Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol*, 16:291-300.
- Prasad A. 1993. Essentiality and toxicity of zinc. *Scand J Work Environ Health. Suppl 1*: 134-136.
- Prasad A. 2020. Lessons learned from experimental human model of zinc deficiency. *Journal of Immunology Research*, vol. 2020.
- Qiao W, Mooney M, Bird A, Winge D, Eide D. 2006. Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6; 103(23):8674-9.

Raklami A, Bechtaoui N, Tahiri AI, Anli M, Meddich A, Oufdou K. 2019. Use of Rhizobacteria and Mycorrhizae Consortium in the Open Field as a Strategy for Improving Crop Nutrition, Productivity and Soil Fertility. *Front Microbiol.* 10: 1106.

Ramsay L, Gadd G. 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification, *FEMS Microbiol. Lett.* 152:293–298.

Rentsch D, Laloï M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB. 1995. NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 370: 264–268.

Rosado JL. 2003. Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds. *The Journal of nutrition*, 133(9), 2985S-2989S.

Ruiz-Herrera J. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico [*Ustilago maydis*: rise of a Mexican fungus from local gastronomy to the scientific world]. *Nova Scientia.* 2008; 1(1):118-135.

Ruiz-Herrera J, & León-Ramírez C. 2012. Development and dimorphism of the phytopathogenic basidiomycota *Ustilago maydis*. In J. Ruiz-Herrera (Ed.), *Dimorphic Fungi: Their Importance as Models for Differentiation and fungal pathogenesis* 1st ed., pp. 105-112.

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

Ruiz-Herrera J, León C, Guevara L, Cárabez A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141:695-703.

Ruiz-Herrera J, Robledo-Briones M and Martínez-Soto D. 2013. *Experimental Pathosystems as a Tool for the Identification of Virulence*

Factors in Pathogenic Fungi. *Biotechnology: Beyond Borders*, CSIR-National Chemical Laboratory, Pune, 30-38.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Arino J. 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol.* 46(5): 1319–1333.

Sharma G, Sharma N. 2013. Cytology as an Important Tool for Solving Evolutionary Problems in Angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. Volume 84, Issue 1, pp. 1-7

Sillanpaa M. 1990. Micronutrient assessment at the country level. An international study. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Simm C, Lahner B, Salt D, LeFurgey A, Ingram P, Yandell B, Eide D. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryot cell* 6: 1166-1177.

Singh M.V. 2001. Evaluation of current micronutrient stocks in different agro-ecological zones of India for sustainable crop production. *Fert. News.* 46, 25-42.

Singh B, Natesan S, Singh B, Usha K. 2005. Improving zinc efficiency of cereals under zinc deficiency. *Current science*, 36-44.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.

SPSS Inc. 2008. *SPSS statistics for windows, version 17.0*. Chicago: SPSS Inc.

- St Croix C, Wasserloos K, Dineley K, Reynolds I, Levitan E, Pitt B. 2002. Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein, *Am. J. Physiol.* 282:L185–L192.
- Stein AJ, Nestel P, Meenakshi JV, Qaim M, Sachdev HP, Bhutta ZA. 2007. Plant breeding to control zinc deficiency in India: how cost-effective is biofortification? *Public Health Nutr.* 10(5): 492-501.
- Suhy D, O'Halloran TV. 1995. Metal responsive gene regulation and the zinc metalloregulatory model. In: Sigel H, ed. *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York; Vol. 32, pp. 557–578.
- Suhy D, Simon K, Linzer D, O'Halloran T. 1999. Metallothionein is part of a zinc scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation, *J. Biol. Chem.* 274:9183–9192.
- Takkar P, Walker C. 1993. The distribution and correction of zinc deficiency. In: Robson, A. (ed). *Zinc in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 151-165.
- Tapiero H, Tew KD. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *BiomedPharmacother.* 57(9): 399-411.
- Teixeira MC, Monteiro PT, Palma M, Costa C, Godinho CP, País P, Cavalheiro M, Antunes M, Lemos A, Pedreira T, et al. 2018. YEASTRACT: an upgraded database for the analysis of transcription regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 46(D1): D348–D353.
- The UniProt Consortium. 2018. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 46(5): 2699.
- Trushina N, Levin M, Mukherjee K, Horwitz B. 2013. PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC Genomics.* 14(1):138.
- Tsukuda, T, Carleton S, Fotheringham S, Holloman WK. 1988. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and cellular biology,* 8(9), 3703-3709.

- Tusnády GE, Simon I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 17(9), 849-850.
- Valdés-Santiago L, Cervantes-Chávez J, Winkler R, León-Ramírez C, Ruiz-Herrera J. 2012. Phenotypic comparison of samdc and spe mutants reveals complex relationships of polyamine metabolism in *Ustilago maydis*. *Microbiology Mar*;158(Pt 3):674-84.
- Valmik K, Berkey C, Miyao T, Carlson M. 2005. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 4(11): 1882–1891.
- Vasak M, Hasler D. 2000. Metallothioneins: new structural and functional insights. *Curr Opin Chem Biol* 4:177–183.
- Vasak M, Kagi J. 1994. Metallothioneins. In: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, vol. 4 (King, R. B., ed.), pp. 2229–2241. Wiley, New York.
- Vicentefranqueira R, Moreno A, Leal F, Calera J. 2005 The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot cell* 4: 837-848.
- Vollmeister E, Schipper K, Baumann S, Haag C, Pohlmann T, Stock J, Feldbrügge M. 2011. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* 36 59–77.
- Wang Z, Feng L, Matskevich S, Venkataraman V, Parasuram K, Laity P. 2006. Solution structure of a Zap1 zinc-responsive domain provides insights into metalloregulatory transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 357, 1167–1183.
- Waters BM and Eide D. 2002. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* 277(37):33749-57.
- Welch R, Graham R. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.* 55(396): 353-364.
- Williams R. 1987. The biochemistry of zinc. *Polyhedron* 6: 61–69.

Wilson D, Citiulo F, Hube B. 2012. Zinc exploitation by pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 8(12): e1003034.

WHO. 2002. The world health report reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva Switzerland.

Xie J, Xing W, Zhou J. 1998. Current use and requirement for nutrients for sustainable food production in China. In: Johnston, A. and Syers, J. (eds). *Nutrient Management for Sustainable Crop Production in Asia*. CAB International, Wallingford, Connecticut, USA, pp. 267-277.

Yakan H, Gürbüz MA, Avşar F, Sürek H, Beşer N. 2000. The effect of zinc application on rice yield and some agronomic characters. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 58, 1-5.

Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genet biol.* 41(11): 973-981.

Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S, Eide D. 1998. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J. Biol. Chem.* 273(44): 28713–28720.

Zhao H, Eide D. 1996a. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(6): 2454–2458.

Zhao H, Eide D. 1996b. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271(38): 23203–23210.

Zhao H, Eide DJ. 1997. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 17(9): 5044–5052.

Zhu Y-G, Christie P, Laidlaw SA. 2001. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. *Chemosphere* 42:193–199.

XII. RESUMEN BIOGRÁFICO

Adriana Mayrel Martha Paz

Candidata para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS DEL ZINC EN *Ustilago maydis* (STEVENSON Y JOHNSON, 1944) (*Ustilaginales*, *Ustilaginaceae*).

Campo de Estudio: Fisiología, genómica funcional y biología molecular de hongos.

Datos Personales: Nacida en Delicias, Chihuahua el 28 de septiembre de 1988, hija de Ramiro Martha Serrato y Rosalía Paz Bonilla.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo con mención honorífica y segundo lugar de generación. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología.

Experiencia Profesional: Maestro de asignatura A en la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, desde el 2015 hasta el 2018.