

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS TIPO LEVADURA ASOCIADOS A *Ustilago maydis*

T E S I S
Q U E P R E S E N T A:

EFREN GUEVARA VAZQUEZ



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**



Chapingo, Estado de México, Enero del 2007

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
 MICROORGANISMOS TIPO LEVADURA ASOCIADOS A *Ustilago maydis***

Tesis realizada por Efrén Guevara Vazquez bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de :

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



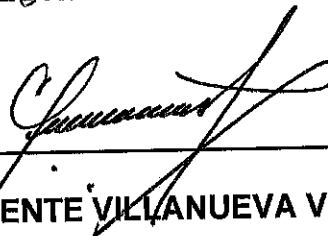
DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESORA:



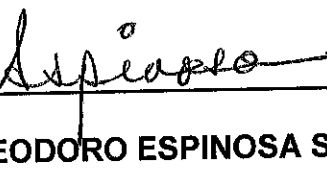
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

ASESOR



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

DEDICATORIA

*A TI QUE TODO ME DAS, ME ACEPTAS COMO SOY ME HAS
ENSEÑADO EL VALOR DE LA VIDA Y EL AMOR MIL GRACIAS*

*A MI CHIQUITO HERMOSO HALI MI OTRA ALEGRÍA A QUIEN
ESPERO SER SIEMPRE EL MEJOR DE LOS EJEMPLOS Y QUE
LLEGUES A SER MEJOR QUE YO*

A ZENA POR TODO LO BUENO COMPARTIDO

*A MI PADRE MI CRÍTICO E INSPIRADOR
†A MI MADRE POR QUE...DESEO QUE ESTES ORGULLOSA DE MI*

*A MIS HERMANOS LES QUIERO COMPARTIR ESTA MI ALEGRÍA
A MIS CUÑADAS Y CUÑADO QUE TAMBIEN LOS SIENTO PARTE DE
MI*

*A MIS SOBRINOS MOTIVENSE A SER MEJORES: CLARO QUE
PUEDEN*

AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), POR EL APOYO BRINDADO.

AL CONSEJO MEXIQUENSE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COMECYT) QUE BRINDO SU APOYO PARA LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO QUE A TRAVÉS DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA ME ABRIÓ LAS PUERTAS PARA SEGUIR MEJORANDO.

A LOS PROFESORES DEL PROGRAMA DE MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL.

A CADA UNO DE LOS INTEGRANTES DE MI COMITÉ ASESOR, POR SU COMPRESIÓN, PACIENCIA Y SER UNOS VERDADEROS GUÍAS EN MI FORMACIÓN

DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

TEODORO ESPINOSA SOLARES

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en la Ciudad de México el día 18 de Junio de 1976, sus estudios a nivel bachillerato los realizó en el CECYT No 6 "Miguel Othon de Mendizábal" del Instituto Politécnico Nacional, fue en la Universidad Autónoma Chapingo donde llevó acabo sus estudios de licenciatura graduándose como Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia el 10 de Noviembre del 2000, en el año 2004 ingresa a la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	I
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Generalidades del "Huitlacoche" (<i>Ustilago maydis</i>)	5
4.2 Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	6
4.3 Clasificación taxonómica	8
4.4 Generalidades de las levaduras	8
4.5 Condiciones para su desarrollo	9
4.6 Efecto "killer" de las levaduras	9
4.7 Evaluación del fenómeno "killer" de las levaduras	10
4.8 Empleo de las levaduras del género <i>Pichia</i> y <i>Candida</i> en el control de algunos microorganismos	14
4.9 Historia de la taxonomía de las levaduras	16
4.10 Importancia del apareamiento en hongos fitopatógenos	16
4.11 Técnicas moleculares	17

4.11.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
4.11.2 Componentes y condiciones de la reacción de PCR	19
4.11.3 Random amplified polymorphyc PCR-RAPD	19
4.11.4 Microsatélites	21
4.11.5 Inter simple sequence repeated PCR-ISSR	22
4.11.6 Inter transcribed spacer (ITS)	23
4.11.7 Secuenciación	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Cepas	26
5.2 Prueba de ureasa llevada acabo para la diferenciación de <i>U. maydis</i> respecto de las levaduras	28
5.3 Efecto antagonista de microorganismos tipo levadura sobre <i>U. mayis</i>	29
5.4 Análisis molecular	30
5.4.1 Extracción de DNA de cepas obtenidas de agallas de <i>U. maydis</i> y teliosporas	30
5.4.2 Tipificación mediante RAPDs de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche	32
5.4.3 Carqacterización mediante ISSR de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche	33
5.4.4Identificación de <i>U.maydis</i> con iniciadores específicos	34
5.4.5 Amplificación de ITS de los microorganismos	36

aislados de agallas de huitlacoche	
5.4.6 Secuenciación del fragmento de ITS obtenido con los iniciadores ITS5 e ITS4	36
5.5 Análisis de los perfiles de bandas obtenidos con RAPD e ISSR	37
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1 Caracterización del crecimiento en medio de cultivo de las cepas obtenidas de agallas de <i>U. maydis</i>	38
6.2 Prueba de ureasa llevada acabo para la dieferenciación de <i>U. maydis</i> respecto de las levaduras	39
6.3 Efecto antagonista de microorganismos tipo levadura sobre <i>U. maydis</i>	41
6.4 Tipificación mediante RAPD de microorganismos aislados de agallas de <i>U. maydis</i>	43
6.5 Caracterización mediante ISSR de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche	46
6.6 Identificación de <i>U. maydis</i> con iniciadores específicos	48
6.7 Amplificación de ITS de los microorganismo aislados de agallas de huitlacoche	49
6.8 Secuenciación del fragmento de ITS de los microorganismos aislados de agallas de huitlacoche	51
VII. DISCUSIÓN GLOBAL	53
VIII CONCLUSIONES	57
IX BIBLIOGRAFÍA	59

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Especies de levaduras que han mostrado tener un efecto "killer" sobre diferentes especies de hongos	11
Cuadro 2	Especies de hongos que mostraron sensibilidad la efecto "killer" de las levaduras	13
Cuadro 3	Cepas obtenidas a partir de agallas de <i>U.maydis</i> colectadas en campo y evaluadas por su patogenicidad en híbridos de maíz	27
Cuadro 4	Reactivo para la prueba de ureasa	29
Cuadro 5	Componentes y su concentración para la reacción de RAPD	33
Cuadro 6	Iniciadores para ISSR considerados en el estudio para la caracterización molecular de cepas de microorganismos aisladas de agallas de <i>U.mayids</i>	34
Cuadro 7	Respuesta de las cepas obtenidas de agallas de <i>U. maydis</i> a la prueba de ureasa	40
Cuadro 8	Microorganismos asociados alas agallas de huitlacoche identificados con la secuenciación del fragmento obtenido con el fragmento de los ITS4 e ITS5	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>U.maydi</i> . A. Germinación de teliosporas, B. Basidiosporas haploides, C. Fusión de basidiosporas compatibles, D. Penetración de micelio en la planta, E. Formación del tumor y F. Teliosporas para reiniciar el ciclo	7
Figura 2	Genes del DNA ribosomal de eucarionte	24
Figura 3	Aspecto del crecimiento de las cepas obtenidas de agallas de <i>U.maydis</i> en medio de cultivo PDA, las cuales presentan un crecimiento levaduriforme de color claro cremoso excepto la cepa M3-A791 que es de color marrón después de 8 días	33
Figura 4	Resultados obtenidos con la prueba de ureasa donde se muestra el cambio color amarillo paja en las cepas ureasa-negativa (ascomycete) y el rojo magenta en la cepa ureasa positiva, indicando que la cepa M3-A-791 corresponde a un organismo basidiomycete en este caso <i>U.maydis</i>	41

Figura 5	Efecto antagónico de los microorganismos tipo levadura (cepa 71 y 81) sobre <i>U. maydis</i> . Nótese que en los puntos de intersección donde coincidieron las cepas de levadura y <i>U. maydis</i> el desarrollo abundante de las levaduras sobre <i>U. maydis</i> después de 8 días de crecimiento en PDA en condiciones de laboratorio	6
Figura 6	Perfiles de bandas obtenidas con el iniciador Roth-A13 en 19 cepas de levaduras aisladas de huitlacoche	45
Figura 7	Dendograma construido con el método de agrupamiento UPGMA y el de Jaccard utilizando la información del iniciador Roth A-13	46
Figura 8	Dendograma construido a partir de los ISSR con las cepas aisladas de agallas de huitlacoche	47
Figura 9	Fragmento de 900 pb amplificado con DNA de la cepa M3-A791 y teliosporas tomadas directamente de una agalla comercial; el fragmento indica que las cepas corresponden a <i>U. maydis</i>	49
Figura 10	Región del DNA ribosoma amplificada con	

los iniciadores ITS4 e ITS5. en dicha figura
se muestra la región reconocida por cada
uno de los iniciadores

50

Figura 11 Fragmento aproximado de 625 pares de
amplificado con ITS marcador utilizado de 1
kb (Marca Fermentas)

50

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
 MICROORGANISMOS TIPO LEVADURA ASOCIADOS A *Ustilago*
 maydis.**

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF YEAST-
 TYPE MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH *Ustilago maydis*.**

Efren Guevara Vazquez¹, Marcelo Acosta Ramos²

RESUMEN

Veintidós cepas obtenidas a partir de agallas de *Ustilago maydis* se inocularon en medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar). Se realizó la prueba de ureasa para identificar aislamientos ascomicetos de basidiomicetos. Solo el aislamiento M3 A-791 fue positivo resultando ser basidiomiceto, esta se sembró en competencia con dos aislamientos ascomicetos para observar si existía un efecto antagónico. El fragmento amplificado con los iniciadores ITS5 e ITS4 se secuenció encontrando que los diecinueve aislamientos secuenciados corresponden a *Pichia guilliermondii*, *Candida railenensis* y *Candida quercitrusa*, las cuales mostraron un efecto antagónico con la cepa M3 A-791 de *Ustilago maydis*.

Palabras clave: ascomicetos, basidiomicetos, *Ustilago maydis*

ABSTRACT

Twenty two isolates obtained from *Ustilago maydis* galls were inoculated in a PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium. A Urease test was carried out to distinguish ascomycetes from basidiomycetes growing. Only the M3 A-791 isolate tested positive for basidiomycete, which was then inoculated in competition with two ascomycetes growing to see if there was an antagonistic effect. The fragment amplified from the ITS5 and ITS4 primers was sequenced, revealing that nineteen isolates correspond to *Pichia guilliermondii*, *Candida railenensis* and *Candida quercitrusa*, which showed an antagonistic effect on the M3 A-791 *Ustilago maydis* isolate.

Key words: ascomycetes, basidiomycetes, *Ustilago maydis*

¹ Tesista, ² Director de tesis

I. INTRODUCCIÓN

Ustilago maydis (*U. maydis*) es el agente causal del carbón común del maíz, que se conoce en México como "huitlacoche". Es un hongo que crece fácilmente en medio de cultivo, dando origen a colonias con un crecimiento tipo levadura de color crema claro amarillento, que cuando madura cambia a una tonalidad marrón. El Huitlacoche es un hongo comestible que también es una enfermedad en el cultivo de maíz y puede tener una incidencia por arriba del 70% causando pérdidas de hasta un 25% en el rendimiento de grano; sin embargo, es tolerado, y algunas veces promovido por los productores de maíz, ya que es un producto consumido y vendido en los mercados a nivel local e incluso procesado por algunas compañías. Es en México donde se reporta que se inició el consumo de huitlacoche en la región central del país y hoy en día se venden alrededor de 400 a 500 toneladas por año en los mercados de la ciudad de México. A nivel mundial se ha incrementado la demanda de este producto entre los países de la Unión Europea, Japón y Estados Unidos donde llega alcanzar un precio de hasta \$20.00 dólares por kilogramo, mientras en México puede variar de \$15.00 por kilogramo durante la temporada normal a más de \$150 por kilogramo fuera de época (Villanueva, 1995).

Se reconocen tres formas principales para la producción de huitlacoche: 1) crecimiento espontáneo; 2) producción empírica llevada a cabo por productores del valle de México y 3) producción con técnicas de inoculación específica.

Entre algunas de las dificultades principales encontradas para llevar a mayor escala la producción de huitlacoche son: 1) se requiere de un alto volumen de inóculo por hectárea; 2) la patogenicidad del hongo depende del cruzamiento de esporidias compatibles de *U. maydis*; 3) la coincidencia con microorganismos tipo levadura que pueden tener un efecto antagónico sobre el crecimiento de *U. maydis*., además que tienen un crecimiento en medio de cultivo muy similar lo que dificulta la obtención de cultivos puros de *U. maydis*. Por lo tanto cobra importancia el llevar a cabo investigaciones que permitan caracterizar e identificar con métodos muy confiables, como las técnicas moleculares, a los microorganismo tipo levadura asociados a *U. maydis*.

II. OBJETIVOS

- Identificar y aislar microorganismos tipo levadura asociados a las agallas de *Ustilago maydis* colectadas en campo, mediante el empleo de técnicas moleculares.
- Determinar si existe un efecto antagónico de microorganismo tipo levadura sobre el crecimiento de *Ustilago maydis* en medio de cultivo

III. HIPÓTESIS

Es posible que microorganismos tipo levadura asociados a las agallas de *Ustilago maydis* de apariencia sana colectadas en campo, limiten su crecimiento en medio de cultivo, mermando la producción masiva de inóculo; por lo que cultivos puros de *Ustilago maydis*, garantizarían la inducción exitosa de huítlacoche sobre mazorcas de maíz.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades del “Huitlacoche” (*Ustilago maydis*)

El hongo basidiomyceto *U. maydis* es el agente causal del carbón común del maíz, conocido en México como huitlacoche. Es una hongo que habita en el suelo y material vegetal (Basse y Farfsing, 2006; Munkacsi B. *et al.*, 2006; Müller P. *et al.*, 2003; Kronstad y Leong, 1988), es un hongo dimórfico con una forma levaduriforme no patogénica en medio de cultivo y una filamentosa o micelial patogénica que induce tumores en el maíz (Banuett y Herskowits, 1989). Es un hongo facultativo que requiere de la planta de maíz para su desarrollo sexual, mientras que sus esporidias haploides tienen un crecimiento tipo levadura que se puede fácilmente propagar en medio de cultivo artificial, creciendo como colonias de aspecto cremoso de color claro amarillento que con el tiempo cambia a un color marrón oscuro (Basse y Farfsing, 2006, Kahmann y Kämper, 2004, Scout E. *et al* 2005, Wang J.*et al*, 1988).

Numerosos hongos patógenos de humanos y plantas muestran un dimorfismo levadura/micelio (Lee y Kronstad, 2002). La patogenicidad es frecuentemente relacionada con una morfología en particular. El hongo fitopatógeno *U. maydis* induce la formación de tumores en plantas de maíz (Munkacsi B. *et al* 2006, Kahmann y Kämper , 2004) y se ha establecido como un sistema modelo para

el estudio del dimorfismo de los hongos y su patogenicidad (Zahiri *et al.*, 2005). Durante su ciclo de vida existe en dos diferentes formas. En su estado haploide el hongo es unicelular y se multiplica por gemación, las células haploides de tipo compatible se reconocen una a otra por medio de feromonas lipopeptídicas y se fusionan para formar el dicarion infeccioso. La reacción al apareamiento es la inducción morfogénica que estimula el crecimiento levaduriforme a un crecimiento filamentoso. La formación del filamento y desarrollo patogénico es controlado por el locus multialélico *b* que codifica un par de factores de transcripción homeodominantes y que actúan como heterodímeros (Mahlert *et al.*, 2006).

4.2. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*

El ciclo de los hongos basidiomycetes involucra diferentes tipos de células en la transición entre sus fases haploide, dicariótica y diploide (Sgarlata y Pérez, 2005).

El desarrollo de *U. maydis* inicia con la germinación de la teliospora diploide. La meiosis produce basidiosporas haploides que se dividen por gemación y no son patogénicas (Müller *et al.*, 2003). Las células haploides compatibles con diferentes alelos en el loci de apareamiento *a* y *b* se fusionan para formar el dicarion filamentoso. Este penetra a la planta, creciendo dentro y entre las células de la misma, estimulando la formación de un tumor (Müller *et al.*, 2003), compuesto por tejido de la planta y el hongo (Figura 1) Durante el desarrollo

del tumor los núcleos se fusionan, el filamento o micelio se fragmenta y las células desarrollan teliosporas. Las teliosporas son células diploides, estructuras de resistencia del hongo, (Sacadura, y Saville, 2003) que se diseminan reiniciando el ciclo que puede completarse de dos a tres semanas bajo condiciones controladas (Babu, *et al.*, 2005, Zahiri, *et al.*, 2005, Sgarlata y Pérez, 2005 , Kahmann y Kämper, 2004 y Kimberly, *et al.*, 2004)

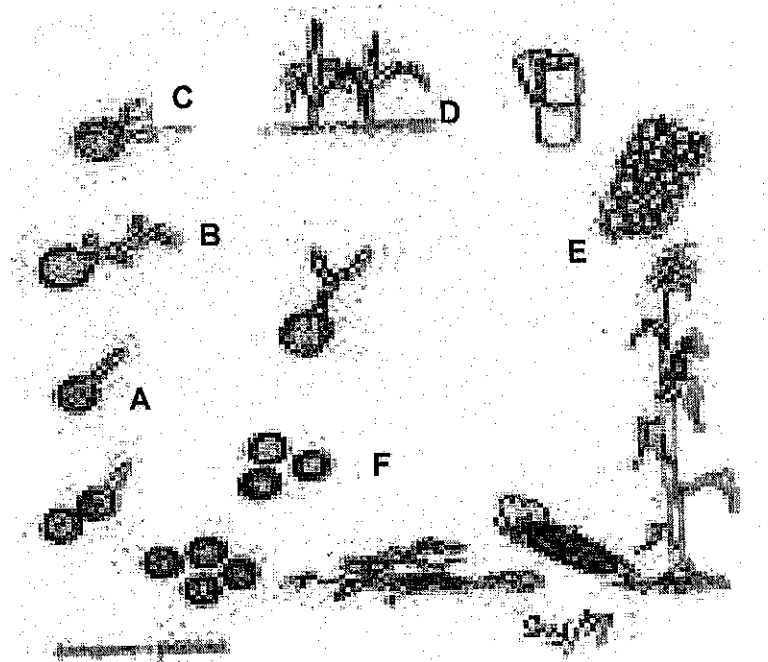


Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. A. Germinación de las teliospora, B. Basidiosporas haploides, C. Fusión de basidiosporas compatibles, D. Penetración del micelio en la planta, E. Formación del tumor, F. Teliosporas para reiniciar el ciclo.

4.3. Clasificación taxonómica

Ustilago maydis es un hongo clasificado en: el Reino fungi; División Eumycota; Subdivisión Basidiomycotina; Clase Heterobasidiomicetes; Orden Ustilaginales; Familia Ustilaginaceae; Género Ustilago; Especie maydis; Nombre científico: *Ustilago maydis* (Herrera y Ulloa, 1990).

4.4. Generalidades de las levaduras

Son organismos unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza que se encuentran sobre hojas, flores, frutos, piel, tracto digestivo de animales. Algunas están asociadas con insectos, pero el suelo es el mayor reservorio. Muchas especies de levaduras existen en la naturaleza en forma haploide, ellas se aparean si son líneas que reaccionan sexualmente mezcladas sobre un medio de esporulación (Wickerham, 1966). En algún momento de su ciclo de vida se multiplican por gemación. Muchas especies tienen su fase sexual (teleomorfo) en los hongos ascomicetos y algunas en los basidiomicetos (Deak y Beuchat, 1996).

4.5. Condiciones para su desarrollo

En cuanto al ambiente en el que se desarrollan la mayoría de las levaduras son mesófilas; es decir, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48 °C. Solo algunas pocas son psicrófilas (con temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24 °C), no hay reportes de levaduras que crezcan a 50 °C y unas pocas pueden desarrollar a 0 °C. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, aunque prefieren un medio ligeramente ácido de 4.5 a 6.5. Las levaduras basidiomicéticas son especialmente tolerantes a pH alcalino. Los aceites esenciales de ajo, canela, cebolla, clavo de olor, orégano, pimienta y jamaica son inhibidores de varios géneros de levaduras (Deak y Beuchat, 1996).

Algunas líneas de levaduras han mostrado una alta actividad antifúngica si se mantienen a temperaturas de 5 a 6 °C (Mari y Guizzardi, 1998).

4.6. Efecto “Killer” de las levaduras

Las levaduras “Killer” secretan polipéptidos tóxicos para otras especies del mismo género que además, suelen inhibir a otros organismos. Este fenómeno se observó en levaduras del género *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Cryptococcus*. Las levaduras

“Killer” pueden ser contaminantes y estas pueden suprimir a levaduras silvestres indeseables (Deak y Beuchat, 1996).

La actividad antagonista puede ser expresada en varias formas: las más comunes son la producción de metabolitos, competencia y parasitismo directo; pero otros mecanismos están involucrados, por ejemplo, la resistencia inducida algunas veces esta asociada con la reducción de la actividad enzimática del patógeno. El uso de levaduras como antagonistas parece ser promisorio, aunque el mecanismo no ha sido totalmente aclarado. Sin embargo, hay indicios de que la competencia por nutrientes y espacio están involucrados. Además, la habilidad de las levaduras para crecer muy rápidamente les da la capacidad de producir enzimas hidrolíticas (β -1,3 glucanasa) capaces de atacar la pared celular y polímeros extracelulares que parecen tener actividad antifúngica, como es el caso de la cepa US-7 de *Pichia guilliermondii* (*P. guilliermondii*) antagonista de *Penicillium digitatum* en frutos de uva y *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) en manzanas. La efectividad antifúngica de una levadura antagonista puede ser incrementada por la adición de sustancias tales como sales de calcio y análogos de azúcares. El cloruro de calcio mejora el control biológico de la levadura *P. guilliermondii* (Mari y Guizzardi, 1998)

4.7. Evaluación del fenómeno “Killer” de las levaduras

Bevan y Makower citados por Polonelli y Morace (1986) reportaron por primera vez en levaduras que unos cuantos aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) secretan una sustancia que era letal para otras líneas de la

misma especie. Desde el descubrimiento original del fenómeno "Killer" de las levaduras, varios reportes se han dirigido a la pregunta de la frecuencia de ocurrencia y rango de especificidad de las toxinas "Killer" propias de las levaduras. Polonelli y Morace (1986) presentaron por primera vez evidencias de la sensibilidad de las toxinas "Killer" de levaduras sobre otros microorganismos eucariontes y bacterias. Estos autores concluyeron que las levaduras producen toxinas que parecen inhibir una amplia variedad de organismos procariontes y eucariontes, en el Cuadro 1 podemos observar diferentes especies de levaduras y líneas de las mismas, de los géneros *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces* que mostraron tener un efecto killer sobre diferentes hongos de los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cunninghamella*, *Kurvularia*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Cuadro 2).

Cuadro 1. Especies de levaduras que han mostrado tener un efecto "Killer" sobre diferentes especies de hongos.

Número	Código	Especie de levadura	Línea
1	K1	<i>Hansenula</i> sp.	Stumm 1034
2	K2	<i>Pichia</i> sp.	Stumm 1035
3	K3	<i>Hansenula anomala</i>	UM3
4	K4	<i>Hansenula anomala</i>	CBS 5759
5	K5	<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn UM 866
6	K6	<i>Hansenula californica</i>	Ahearn WC 40
7	K7	<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn WC 41
8	K8	<i>Hansenula dimennae</i>	Ahearn WC 44

9	K9	<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn WC 51
10	K10	<i>Pichia kluyveri</i>	Stumm 1002
11	K11	<i>Hansenula anomala</i>	UT 12
12	K12	<i>Hansenula bimundalis</i>	Ahearn WC 38
13	K13	<i>Hansenula fabianii</i>	CBS 5640
14	K14	<i>Hansenula petersonii</i>	Ahearn WC 53
15	K15	<i>Pichia guilliermondii</i>	UT 19
16	K16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CDC B 2210
17	K17	<i>Hansenula bimundalis</i>	CBS 5642
18	K18	<i>Hansenula fabianii</i>	Ahearn WC 45
19	K19	<i>Hansenula holstii</i>	CBS 4140
20	K20	<i>Hansenula subpelliculosa</i>	CBS 5767
21	K21	<i>Pichia ohmeri</i>	CBS 5367
22	K22	<i>Candida guilliermondii</i>	UCSC 0
23	K23	<i>Candida maltosa</i>	UCSC 0
24	K24	<i>Pichia spartinae</i>	UCSC 0
25	K25	<i>Hansenula nonfermentans</i>	UM 200
26	K26	<i>Pichia carsonii</i>	CBS 810
27	K27	<i>Pichia farinosa</i>	CBS 185
28	K28	<i>Pichia guilliermondii</i>	CBS 2031
29	K29	<i>Candida pseudotropicalis</i>	UP 241
30	K30	<i>Candida pseudotropicalis</i>	UP 254
31	K31	<i>Candida pseudotropicalis</i>	UP 330
32	K32	<i>Pichia kluyveri</i>	UP 5F
33	K33	<i>Pichia kluyveri</i>	UP 6F
34	K34	<i>Pichia membranaefaciens</i>	UP 10F
35	K35	<i>Pichia kluyveri</i>	UP 11F
36	K36	<i>Hansenula anomala</i>	UP 25F

Fuente: Polonelli y Morace, 1986

Cuadro 2. Especies de hongos que mostraron sensibilidad al efecto "Killer" de las levaduras.

Organismo evaluado	Levadura "killer" con actividad inhibitoria
<i>Aspergillus flavus</i>	
UCSC 0	1,3-24,26-29,32-36
UCSC 2	4-24, 28, 30, 33-36
<i>Aspergillus fumigatus</i>	
UCSC 4	3-11, 13, 20, 21, 27, 33-36
<i>A. nidulans</i>	
UCSC 0	1-12, 17-20, 22, 30, 32-36
<i>A. Níger</i>	
UCSC 0	9-11, 20, 21, 29-31, 33-36
UCSC 1	1-9, 11-13, 19, 21, 22, 29-31, 36
UCSC 2	1,2,5-9, 11-16, 21, 26-29,32-36
<i>A. parasiticus</i>	
CBS 103.13	2-8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	
UCSC 1	1-9, 11, 13, 20, 36
<i>Cunninghamella elegans</i>	
CBS 161.28	1-9, 20, 21, 23, 29-31, 36
<i>Curvularia</i> sp.	
NCMH 2007	3-11, 17-24, 26, 27, 29-32, 34-36
<i>Exophiala yeanselmei</i>	
UCSC 2	1-25, 29-31, 33-36
<i>Fonsecaea pedroso</i>	
UCSC 2	1-14, 16-26, 29-36

<i>Penicillium camembertii</i>	
Frisvat BB	5-9, 11, 12, 19, 21, 27, 29-31, 35,36
Frisvat PD	5-9, 27, 29-31, 34-36

P. melanochlorum

Frisvat FTLS 193 1,2, 9-29, 32-36

Rhizopus microsporus var

microsporus

CBS 699.68 1-8, 21

Fuente: Polonelli y Morace, 1986

4.8. Empleo de levaduras del género *Pichia* y *Candida* en el control de algunos microorganismos

Peterson y Schnurer (1995), encontraron que las especies *Pichia anomala* (*P. anomala*), *P. guilliermondii* y *S. cerevisiae* tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Penicillium roqueforti* cuando se inocularon sobre trigo a concentración de 1×10^5 y 1×10^6 UFC para las dos primeras especies, y de 1×10^5 a 1×10^7 UFC para el caso de *S. cerevisiae*. Así mismo Horn y Corner (2002), mostraron que *Aspergillus flavus* restringió su crecimiento cuando se encontraba en competencia con *Pichia funiculosum* y *P. guilliermondii* cuando se sembraron en PDA a 30°C.

Saligkarias, et al., 2006, demostraron que la cepa US-7 y 101 de *P. guilliermondii* redujo la infección en tallos de jitomate por parte de *B. cinerea* en un 70 y 80% cuando se aplicó de manera simultanea con el patógeno, a

concentración de 2.5×10^5 UFC mm⁻². Cuando las levaduras se aplicaron 24 horas antes de la inoculación con *B. cinerea*, en todos los casos la actividad de biocontrol mejoro significativamente.

P. guilliermondii requiere de líneas de sexo apuesto para aparearse y producir un cigoto heterogámico o isogámico. Las ascas contienen una a dos esporas y esta se rompe al madurar. Las ascosporas son en forma de sombrero, ligeramente coronadas, y después de la liberación del asca, se dilatan. Produce una hifa no verdadera y las células individuales o en pares son elipsoidales, ovoides y clavadas (Wickerham, 1966)

La cepa *Candida sake* (*C. sake*) muestra una gran capacidad inhibidora del desarrollo de las principales enfermedades de postcosecha tanto en manzanas como peras. Esta cepa de levadura está muy adaptada a las temperaturas bajas y a las condiciones de atmósferas modificadas, obteniéndose en estas condiciones, mejores resultados en el control de un gran número de hongos patógenos. En condiciones de conservación de frutas, la cepa *C. sake* a la concentración de 2×10^6 UFC/mL, mostró una capacidad excelente de reducción de pudriciones causada por *Penicillium expansum*. (Viñas et al, 1999).

El biocontrol de la pudrición causada por la mole gris fue efectivo cuando *Candida oleophila* se aplicó a frutos frescos ligeramente heridos, con heridas de un día (Mari y Guizzardi, 1998).

4.9. Historia de la taxonomía de las levaduras

La taxonomía de las levaduras ha transitado por dos periodos, el primero caracterizado por un fuerte estudio de la morfología comparativa, la fisiología y genética convencional, y una segunda etapa identificada por una ampliación en los estudios de morfología a nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos y la introducción de los estudios de biología molecular. Entre los principales aportes de la segunda etapa, se destacan la diferenciación por microscopio electrónico de transmisión de las fases levaduriformes de los ascomycetos y basidiomycetos y la aplicación de los perfiles de ácidos nucleicos para la identificación de géneros, especies y cepas, técnicas de secuenciación de DNA/RNA, cariotipado y el estudio de los patrones de restricción de los RNAs (Orberá, 2004).

4.10. Importancia del apareamiento en hongos fitopatógenos

El término apareamiento es usado para indicar una regulación genética para un cruzamiento específico y desarrollo sexual en muchos hongos filamentosos y no filamentosos. Los genes del tipo de apareamiento regulan la compatibilidad sexual y reproducción en los hongos. El conocimiento del tipo de apareamiento es importante para entender el rol central de la reproducción sexual en el ciclo de vida de los hongos, y la influencia del sexo sobre la genética de poblaciones y evolución de las especies.

Los hongos ascomycetes y basidiomycetes forman un subgrupo monofilético dentro de los hongos superiores que incluyen hongos filamentosos, no filamentosos y dimórficos. La caracterización de determinados tipos de apareamiento en hongos ha heredado componentes familiares y mecanismos regulatorios inicialmente encontrados en levaduras. Para el caso de *U. maydis* el locus *a*, codifica genes que dan origen a feromonas (*mfa1* y *mfa2*) y receptores de feromonas (*pra1* y *pra2*). El rol de los genes ha sido establecido por evaluación del comportamiento en el apareamiento de líneas que llevan mutaciones por inserciones en dichos genes y transformación de genes individuales dentro de líneas de un apareamiento opuesto específico. Por otro lado el locus *b* es responsable de la codificación de dos genes que dan origen a dos proteínas que regulan la transcripción de un grupo de genes marcados, que directa o indirectamente controlan la transición morfogénica y patogenicidad de *U. maydis* (Kronstand y Staben, 1997 y Gold *et al*, 2005).

4.11. Técnicas moleculares

4.11.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es un método poderoso con una muy amplia aplicación en biología molecular. Esta reacción permite la amplificación *In Vitro* de fragmentos específicos de DNA a partir de una muestra compleja mediante la enzima termoestable DNA polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*; es decir, esta

tecnología permite copiar n veces un fragmento de DNA de interés, utilizando iniciadores que flanquean en ambas direcciones esta región. La PCR se ha venido desarrollando con bastante éxito desde que fue patentada en 1985 y se ha aplicado en diferentes campos del conocimiento como, medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense, criminalística, etc.(Valadez y Kahl, 2000).

Todos los componentes de la reacción de PCR son mezclados y el procedimiento consiste de una sucesión de tres pasos, los cuales se determinan por las condiciones de temperatura y tiempo de exposición a la misma, reconocidos como: desnaturalización del DNA molde, alineamiento del iniciador y extensión del mismo. En el primer paso, la incubación de la mezcla de reacción a una temperatura alta (90 a 95 °C) permite la desnaturalización de la doble cadena de DNA molde, después el enfriamiento de la mezcla a la temperatura apropiada (variable) para que el iniciador forme un híbrido momentáneo (cadena doble de DNA) en dirección 5'-3' y finalmente la extensión, en donde la enzima DNA polimerasa sintetiza a partir del extremo 3' del iniciador, el complemento de bases de la cadena molde normalmente con una temperatura de 72 °C. Esta secuencia de tres pasos corresponde a un ciclo de PCR; en el segundo ciclo, el nuevo DNA sintetizado es separado del original por desnaturalización y cada hebra sirve como molde para el alineamiento y extensión .respectiva. Generalmente se incluye un último paso de extensión final, en donde se completa la síntesis de todos aquellos fragmentos que quedaron incompletos durante el termociclaje. Teóricamente, n

ciclos de PCR permiten una amplificación de 2^n secuencias de DNA. Una reacción de PCR suele llevar de 30 a 40 ciclos. Todos los componentes están presentes desde el inicio de la reacción, y el procedimiento de la amplificación es automatizado en un termociclador con programación de calentamiento y enfriamiento (Edel, 2005).

4.11.2. Componentes y condiciones de la reacción de PCR

El DNA molde, los iniciadores, la DNA polimerasa y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) están mezclados en un buffer apropiado que contiene iones de magnesio como $MgCl_2$. El volumen de reacción generalmente es de 25 a 100 μL . La concentración de los diferentes componentes es de 10 a 100 ng para el DNA molde, $MgCl_2$ de 0.5 a 5 mM, dNTPs 20 a 200 μM , iniciador 0.1 a 0.5 μM , *Taq* polimerasa 0.5 a 2.5 unidades, amortiguador para el funcionamiento de la enzima de acuerdo a las indicaciones del proveedor y agua hasta ajustar el volumen final de la reacción (Valadez y Kahl, 2000).

4.11.3. Random amplified polymorphic PCR-RAPD

Desde comienzo de la década de los 90, se han desarrollado una serie de técnicas basadas en PCR para la genitipificación de los organismos; que a diferencia de otros métodos, no requiere un conocimiento previo de las secuencias específicas de DNA o genes de los organismos examinados. Entre ellas la técnica de RAPD's (Random amplified polymorphic DNA) es la más

utilizada debido a su sencillez (Torres y Moreno, 2001). Esta técnica utiliza pequeños iniciadores de oligonucleótidos de secuencias aleatorias de 6 a 10 nucleótidos con un contenido de GC mayor al 50% (Valadez y Kahl, 2000).

Los polimorfismos detectados pueden teóricamente resultar por varios tipos de eventos ocurridos en el DNA: 1) inserción de un fragmento grande de DNA entre el sitio de reconocimiento por el iniciador que puede exceder la capacidad de la reacción de PCR, dando por resultado pérdida de ese fragmento durante la reacción; 2) la inserción o delección de pequeños fragmentos de DNA indicando un cambio en el tamaño del fragmento amplificado; 3) la pérdida por mutación de uno de los dos sitios de alineamiento del iniciador dando por resultado la pérdida del fragmento; 4) la sustitución de un nucleótido dentro de uno o ambos sitios blanco para el iniciador que pueda afectar el proceso de alineamiento, lo cual puede indicar una presencia contra una ausencia de polimorfismo o un cambio en el tamaño del fragmento (Kahl, 2005).

Dentro de las principales ventajas del empleo de los RAPD's se puede citar que es una técnica relativamente rápida, no se precisa un conocimiento previo del genoma, se necesitan pequeñas cantidades de DNA (alrededor de 5 – 50 ng de DNA por reacción), es una técnica relativamente económica, son marcadores que abundan en el genoma, por lo que el número de polimorfismos que se pueden encontrar es ilimitado (Valadez y Kahl, 2000, y Torres y Moreno, 2001). Los marcadores obtenidos con esta técnica se comportan de forma parecida a la herencia dominante referida en la genética mendeliana, ya

que ambos son presentes o ausentes; por ejemplo, un fragmento es visto en situación de homocigosis (AA) así como en heterocigosis (Aa), y solo la ausencia del fragmento claramente revela el genotipo (aa). William y Fritsch y Rieseberg encontraron que al menos del 95% de los fragmentos de RAPD's eran marcadores dominantes, mientras que el resto se comportó como codominante (Kahl, 2005). Los marcadores RAPD's, proporcionan un método rápido para generar mapas genéticos y analizar poblaciones provenientes de diferentes cultivares de plantas, especies de un género o diferentes géneros de una familia (Valadez y Kahl, 2000)

Esta técnica también se ha empleado para la diferenciación de aislamientos patogénicos y no patogénicos de *Fusarium oxysporum* mediante los polimorfismos exhibidos, así como para la separación de razas entre los diferentes aislamientos (Manulis, *et al*, 1993).

4.11.4. Microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como secuencias repetidas simples (SSR), consisten de secuencias 2 a 10 pares de bases repetidas en tandem a lo largo del genoma de los organismos eucariontes (Valadez y Kahl, 2000; Kahl, 2005; Torres y Moreno, 2001) y rara vez presentes en procariontes (Li, *et al.*, 2004). El término microsatélite fue introducido por Litt y Luty (1989) citados por Torres y Moreno (2001) para describir un nuevo marcador que permite analizar estas regiones mediante PCR, ya que al ser secuencias altamente

variables en el número de las unidades que los integran, hace que su análisis sea extremadamente útil en la búsqueda de polimorfismos. Para ello, es necesario diseñar iniciadores que sean complementarios a las secuencias que flanquean la región de los SSR que se quieren amplificar (Torres y Moreno, 2001). La variación dentro de los genes debe ser muy crítica para la actividad normal de estos, por que la codificación, expansión o contracción de los SSR afecta directamente los correspondientes productos de los genes e incluso causa cambios fenotípicos. En eucariontes el efecto de SSR sobre regiones codificadoras han sido extensamente estudiadas sobretodo en enfermedades humanas (Li, *et al.*, 2004)

La presencia de SSR en procariontes es rara, pero cuando ocurre esta relacionada a organismos patogénicos, su variación en número de repeticiones también puede causar cambios fenotípicos (Li, *et al.*, 2004)

4.11.5. Inter simple secence repeated PCR-ISSR

Mediante esta técnica introducida en 1994 por Zietkiewicz citado por Wolf (2005) y Torres y Moreno (2001) es posible realizar una aproximación a las regiones de microsatélites sin necesidad de un conocimiento previo sobre las mismas (Torres y Moreno, 2001). Estos marcadores fueron introducidos inicialmente para estudios en plantas cultivadas, pero han sido usados para estudios de hibridación, especiación, poblacionales y conservación genética, investigación sistemática y también en el estudio de poblaciones de hongos.

Para ello se utiliza un único iniciador del tipo microsatélite, el cual es frecuente que lleve de 1 a 3 nucleótidos arbitrarios en uno de sus extremos y que tiene por objeto que la amplificación sea más específica, restringiéndose solo a una parte de los loci que contienen el microsatélite analizado. Esta técnica ha mostrado ser más eficiente que los microsatélites, ya que permite detectar mayor variabilidad genética, específicamente si sus productos son separados en geles de poliacrilamida. El número de productos amplificados depende de la longitud y el tipo del iniciador utilizado (Valadez y Kahl, 2000; Torres y Moreno 2001).

Los ISSR han sido usados como otro método para caracterizar la variación genética dentro de los hongos. Esta técnica primero se mostró como un procedimiento para medir diversidad genética en plantas y animales. Hantula citado por Menzies (2002) mostró que era viable para generar marcadores de DNA en una gran variedad de hongos ya que permite la detección de polimorfismos intra e inter específicos. También encontró que los ISSR son comunes en genomas de *Ustilago* spp por medio de investigaciones llevadas a cabo sobre todas las secuencias de *Ustilago* disponibles (Menzies, 2002).

4.11.6. Inter transcribed spacer (ITS)

La región ITS es altamente conservada intraespecíficamente, pero variable entre diferentes especies y esto es frecuentemente usado en taxonomía (Gomes, *et al*, 2002).

Los genes del RNAr de los eucariontes conocidos como DNA ribosomal o DNAr, se encuentran como parte de unidades repetidas que están arregladas en tandem, localizados en sitios del cromosoma conocidos como regiones del organizador nucleolar (NORs), conteniendo al menos 30000 copias por célula. Cada unidad repetida consiste de una región transcrita, que tiene a los genes 18S, 5.8S y 28S RNAr, el espacio transcrito externo conocido como ETS y el espacio transcripto interno entre cada uno de estos genes que es referido como ITS1 e ITS2. En otra unidad transcripcional adyacente a ésta se encuentra ubicado el gen 5S. Estas dos unidades están separadas por un espacio no transcripto llamado NTS, Sharman, *et al.*, 2006. (Figura 2).



Figura 2. Genes del DNA ribosomal de eucariontes

La longitud y secuencia de la región repetida ITS del DNAr se cree que evoluciona rápidamente y por lo tanto pueden variar. Los iniciadores de PCR universales diseñados a partir de regiones ampliamente conservadas que flanquean los ITS son relativamente pequeños (600-700 pb), permiten la fácil amplificación de esta región debido al alto número de copias de DNAr repetidas. Estas particularidades hacen de esta región un objeto interesante para investigaciones de evolución y filogenia (Sharma, *et al.*, 2006).

Un iniciador disponible para amplificar el ITS del DNAr tiende a mejorar la especificidad para ascomicetos, que se identificó por revisión de las secuencias de DNAr de hongos en el GenBank. La especificidad del iniciador llamado ITS4A, se evaluó con DNA extraído de varias especies de ascomicetos, basidiomicetos, zygomycetos, mastigomicetos y hongos mitospóricos y de plantas. La temperatura de alineamiento más específica para ascomicetos resultó ser 62 °C y 64 °C para el par de iniciadores ITS5 + ITS4 (iniciadores forward y reverse, respectivamente) e ITS1F + ITS4A (iniciadores forward y reverse, respectivamente). En estas temperaturas de alineamiento, todos los DNA de ascomicetos se amplificaron eficientemente con el iniciador ITS4A (Larena, *et al*, 1999).

4.11.7. Secuenciación

La determinación de la secuencia de bases en el DNA es un procedimiento relativamente fácil gracias al desarrollo de equipos automatizados, los cuales producen una serie de moléculas que difieren en longitud por un nucleótido que puede ser separado por electroforesis capilar (Church, 2006).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas

Se utilizaron 20 cepas aisladas de agallas de *U. maydis* (Cuadro 3) preservadas en tubos de ensaye con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y aceite mineral. Se sembró una porción de agar con cultivo de cada cepa en cajas petri conteniendo el mismo medio para activar su desarrollo, además de cloramfenicol (500 ppm) para evitar contaminación exógena (Villanueva, 1995). Además como control positivo se incluyó la cepa M3 A-791 de la misma colección, que a diferencia del resto presentaba un cambio de coloración de amarillo cremoso a marrón después de 8 días en medio de cultivo PDA; así como un aislamiento (AC, experimental) de agallas de adquirido en el mercado local.

Para obtener la cepa del mercado la local, las agallas se desinfestaron por inmersión en una solución de cloro comercial 1% por tres minutos, después se lavó por triplicado en agua destilada estéril, para posteriormente abrir la agalla y tomar una porción de su interior (teliosporas) que se colocaron en cajas petri con el mismo medio y antibiótico.

Cuadro 3. Cepas obtenidas a partir de agallas de *Ustilago maydis* colectadas en campo y evaluadas por su patogenicidad en híbridos de maíz.

Cepa	Origen	Observación
9	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
26	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
28	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
42	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
65	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
70	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
71	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
73	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
80	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
89	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
81	Agalla colectada en campo	Inoculación sobre maíz H-135
MH	Colecta H-135, Cholula, Puebla	Colectada en 1998
MH'	Descendencia de MH	
MN	Colecta maíz negro, Chapingo, Méx	Colectada en 1998
MN'	Descendencia de MN	
MNH	Mezcla de MH y MN	Colectada en 1998
MNH'	Descendencia MNH	
MZC	Mezcla de las telias 26,28,38,4,42,65,70,71,73, 80,81,89	Colectada en 1998
MZC'	Descendencia de MZC	
30G40	Agalla colectada en campo	Inoculada sobre maíz 30G40 en el año 2006
M3-A791*	Agalla colectada en campo	Inoculada sobre maíz A-791
AC**	Agalla colectada en campo	Colectada en mercado local 2006

* Cepa de *U. maydis* considerada como control positivo

**Cepa experimental proveniente de huitlacoche fresco

5.2. Prueba de ureasa llevada a cabo para la diferenciación de *U.maydis* respecto de las levaduras

Debido a que el desarrollo en medio de cultivo de las levaduras y *U. maydis* es muy similar en forma y color, es difícil diferenciar unos de otros en los primeros días de su desarrollo; por ello se decidió aplicar la prueba rápida de ureasa, que permite separar un microorganismo basidiomycete de un ascomycete, por el cambio de color que presenta. La prueba consistió en preparar el reactivo correspondiente (Cuadro 4) y colocar 5 mL de éste en tubos de ensayo estériles, que fueron inoculados con una asada de cada una de las cepas correspondientes; posteriormente, los tubos se incuban por 4 horas a temperatura de 28 °C. La prueba se consideró como positiva cuando el contenido de los tubos cambió de color amarillo paja a rojo magenta, indicando que el microorganismo es un basidiomiceto; pero la prueba es negativa cuando los tubos no sufren cambio en el color, indicando la presencia de microorganismos ascomicetos (Schaad, *et al.*, 2001).

Cuadro 4. Reactivo para la prueba de ureasa.

Nombre/Marca	Reactivo/Formula	Para preparar 800 mL de reactivo
Difosfato de amonio	NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 g
Fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	0.5 g
Sulfato de magnesio repta hidratado	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
Cloruro de sodio	NaCl	5.0 g
Bioxon catalogo 155-3	Extracto de levadura comercial	1.0 g
Colorante	Rojo de cresol	16 mg

Fuente: Schaad, *et al*, 2001. Después de mezclar y esterilizar los reactivos anteriores, se agregaron 20 g de urea (marca Baker) a 180 mL de agua destilada filtrada y esterilizada, esta última solución se adicionó a los 800 mL preparados con los resto de los reactivos.

5.3 Efecto antagonista de microorganismos tipo levadura sobre *Ustilago maydis*

Se cultivó en 20 cajas petri con medio de cultivo PDA más cloranfenicol (500 ppm) la cepa correspondiente al control positivo (M3 A-791). Diez de estas cajas se estriaron con la cepa marcada con el número 81 y las diez restantes con la cepa número 71. Se utilizaron ambas levaduras de ascomycetes según la prueba de ureasa con la finalidad de observar un posible efecto antagonista sobre el control positivo de *U. maydis*, previamente corroborado mediante la prueba de ureasa y PCR específica.

5.4. Análisis molecular

5.4.1. Extracción de DNA de cepas obtenidas de agallas de *U. maydis* y teliosporas

Para la obtención del DNA, se desarrollaron durante dos días en medio de cultivo PDA más cloranfenicol 500 ppm cada una de las cepas descritas en el Cuadro 3. Aún cuando se evaluaron diferentes protocolos de extracción, se decidió utilizar el protocolo adecuado por Gómez (2006) para el aislamiento de DNA de larvas de insectos, con el que se obtuvo un DNA óptimo para la aplicación de las técnicas moleculares consideradas. Previo a la extracción de DNA a partir de la agalla de maíz procedente del mercado local, las teliosporas se colocaron en un microtubo y se lavaron con cloro 1% por tres minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril. En seguida se centrifugaron durante 30 segundos a 5000 rpm. El proceso de extracción consistió en lo siguiente:

1. Se tomó una muestra abundante del microorganismo con ayuda de un asa bacteriológica y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL.
2. Se agregaron 500 µL del amortiguador de extracción que contenía NaCl 0.1 M, sacarosa 0.2 M, Tris HCl 0.1M, EDTA 0.05 M y SDS 1%.
3. Posteriormente se mezcló con ayuda de un vortex por 30 segundos
4. Los tubos de incubaron durante 30 minutos a 65 °C.
5. Se adicionaron 160 µL de acetato de potasio 5 M y se agitaron para que el acetato se mezclara en el amortiguador.

6. Las muestras se incubaron en frío por 30 minutos.
7. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 13,200 rpm.
8. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isomálico 24:1.
9. Nuevamente los tubos se centrifugaron por 5 minutos a 13,200 rpm.
10. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se adicionó RNAsa (200 µg/mL) a cada uno de ellos.
11. Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 1 hora.
12. Se agregó un volumen de isopropanol a cada tubo y se mantuvieron en el congelador durante 2 horas para precipitar el DNA.
13. Después se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 13,200 rpm y se decantó el sobrenadante para recuperar la pastilla formada en el fondo del cada tubo.
14. Posteriormente para lavar la pastilla de DNA se adicionó 1 mL de etanol 70% y se mezclaron por inversión suavemente.
15. Se centrifugaron nuevamente por 5 minutos a 13,200 rpm y se decantó el alcohol de los tubos y se mantuvieron invertidos sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de alcohol.
16. Finalmente la pastilla de DNA se resuspendió con 50 µL agua estéril grado HPLC y se mantuvo a 4 °C.

La calidad e integridad del DNA se determinó en geles de agarosa 0.8 %. La concentración del mismo, se determinó con un espectrofotómetro PERKIN ELMER LAMDA BIO a una longitud de onda de 260 nm, además de la relación

260/280 nm, respectivamente. De cada muestra de DNA se hizo una dilución a 20 ng/ μ L para realizar las amplificaciones con PCR.

5.4.2. Tipificación mediante RAPD de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

Una de las herramientas eficaces para conocer la diversidad genética entre los organismos, es la comparación de fragmentos de DNA polimórfico obtenidos con la técnica RAPD. Con la finalidad de conocer la naturaleza de los 20 aislamientos obtenidos de agallas de huitlacoche (Cuadro 3), se optó en este trabajo por aplicar la técnica de RAPD, para lo cual se utilizaron diferentes iniciadores, los 20 de la serie Roth-A, 10 de la serie Roth-C (03, 06, 09, 12, 13, 15, 17, 18, 19 y 20) y 5 de la serie Roth-K (01, 04, 07, 12 y 17). Las reacciones de amplificación, se llevaron acabo en un termociclador Thermo Gen PCR System 9700 con el programa de termociclaje siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C, 1 minuto, 35 ciclos [94 °C, 30 segundos; 40 °C, 30 segundos; 72 °C 1.5 minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 2.5 minutos.

La concentración de los componentes para las reacciones de RAPDs se indican en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Componentes y su concentración para la reacción RAPD

Componente	Concentración	Volumen/tubo
DNA	100 ng/ μ L	5 μ L
Iniciadores	20 pM	2 μ L
Enzima <i>Taq</i> Polimerasa	1.5 U	0.3
Amortiguador de <i>Taq</i>	1X	2.5 μ L
MgCl ₂	2 mM	2 μ L
dNTP's	200 mM	10 μ L
H ₂ O	Ajustar 25 μ L	Ajustar a 25 μ L

Fuente: Elaborado con datos tomados de Valadez y Kahl, 2000.

5.4.3. Caracterización mediante ISSR de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

Con la finalidad de extender la caracterización molecular de los organismos en estudio, también se utilizó la técnica de ISSR donde se emplearon 5 diferentes iniciadores (Cuadro 6); de los cuales, finalmente se seleccionaron tres [(GA)₈ YC, (AC)₈ YG, (CA)₇ D*B*D*A] en base a la información que proporcionaron. La visualización de los fragmentos amplificados se hizo en geles de poliacrilamida relación 29:1 a una concentración final de 8%; la tinción de los geles se llevó acabo con AgNO₃ de acuerdo con Sambrook *et al.*, (1989). La reacción de PCR se llevo acabo en el mismo termociclador utilizado para los RAPDs, con el programa de termociclaje siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C, 4 minuto, 35 ciclos [95 °C, 1 minuto; 55 °C, 1 minuto; 72 °C, 2 minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

Los componentes y concentración fueron los mismos que se emplearon para la reacción de PCR-RAPDs

Cuadro 6. Iniciadores para ISSRs considerados en el estudio para la caracterización molecular de cepas de microorganismos aisladas de agallas de *U. maydis*.

SECUENCIA	COMPANÍA
(GA) ₈ Y*C	GENOSYS
(AC) ₈ YG	GENOSYS
(CA) ₇ D*B*D*A	GENOSYS
(TCC) ₅ AY	GENOSYS
(CA)RT	GENOSYS

* B= G + T + C; D= G + A + T; Y= C + T

A= Adenina; C= Citocina; G=Guanina; T= Timina

5.4. 4. Identificación de *U. maydis* con iniciadores específicos

U. maydis puede ser confundido con otros hongos que afectan al maíz ya que ambos síntomas muy similares en plantas de maíz (Xu *et al*, 1999). Cuando *U. maydis* crece en medio de cultivo presenta un desarrollo levaduriforme, lo que puede ocasionar una fácil confusión con otros organismos asociados en la agalla, como es el caso de las levaduras. Para poder identificar o diagnosticar la presencia de *U. maydis* mediante el uso de técnicas moleculares, Xu *et al.*, (1999) diseñaron un par de iniciadores los cuales generan un fragmento de 900 pb cuando el producto de PCR se visualiza en geles de agarosa 1%. Para llevara cabo la amplificación del fragmento mencionado los iniciadores se

mandaron sintetizar en la compañía Sigma aldrich Co. La secuencia del par de iniciadores es la siguiente:

UM 11 Forward 5'- GAA CCT TTC TGG CCT CCT TT- 3'

UM 11 Reverse 5'- CCT TGG TTT CCG TTC CGT AC- 3'

Los componentes de la reacción de PCR y concentración de los mismos fue la misma que para el caso de la reacción de RAPD e ISSR.

Todas las cepas obtenidas de agallas de *U. maydis* (Cuadro 3) se sometieron a la evaluación con el par de iniciadores específico bajo el programa de termociclaje siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C, 1 minuto; 1 ciclo a 56 °C, 1 minuto; 1 ciclo a 72 °C, 2 minutos; 36 ciclos [94 °C, 1 minuto; 56 °C, 1 minuto; 72 °C, 2 minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

5.4.5. Amplificación de ITS de los microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

Del total de las cepas que resultaron negativas para la prueba de la ureasa, se consideraron solamente las primeras 19 del Cuadro 3, para amplificar con PCR las regiones correspondientes a los ITS. Se utilizaron los iniciadores denominados ITS5 que reconoce el extremo final del gen 18S y el iniciador ITS4 que reconoce el inicio pero en sentido inverso del gen 28S del DNA ribosomal. Con estos iniciadores se obtiene un fragmento de aproximadamente 625 pb cuando se visualizan en geles de agarosa al 1%. El programa de termociclaje utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C, 4 minutos, 35 ciclos [95 °C, 1 minuto; 55 °C, 1 minuto; 72 °C, 2 minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

5. 4. 6. Secuenciación del fragmento de ITS obtenido con los iniciadores ITS5 e ITS4

El fragmento amplificado con los iniciadores para ITS se limpió con el kit de purificación de productos de PCR QIACLEAN marca QIAGEN siguiendo los pasos del fabricante. Una vez purificados los fragmentos, se secuenciación, las secuencias obtenidas se editaron con ayuda de los software Finch TV y BioEdit y se compararon con las reportadas para *U. maydis* en el GenBank con ayuda del programa BLAST.

5. 5. Análisis de los perfiles de bandas obtenidos con RAPDs e ISSR

Para el análisis estadístico de los fragmentos obtenidos con RAPDs, se realizó una matriz binaria considerando los dígitos 0 y 1, donde cero correspondía a la ausencia del fragmento en un determinado organismo; y el uno, a la presencia de dicho fragmento en los organismos que lo presentaban. Los datos obtenidos se analizaron con los índices de similitud de Jaccard citado por Sneath (1973), con ayuda del procedimiento SHAN del software NTSYS ver 2.2.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del crecimiento en medio de cultivo de las cepas obtenidas de agallas de *Ustilago maydis*

El aspecto de las colonias reaisladas en el medio de cultivo de las cepas señaladas en el Cuadro 3, fue similar en todas, con un crecimiento de color amarillo cremoso, mate y cóncavas de consistencia mucoide; este tipo de crecimiento corresponde con el que presentan microorganismos como las levaduras (www.doctorfungus.edu). El hongo fitopatógeno causante del carbón común del maíz (*U. maydis*), se puede cultivar fácilmente en condiciones de laboratorio (Kronstad y Leona, 1988 y Wang, *et al.*, 1987) y presenta características muy similares a las observadas en las colonias reaisladas, cuando éste se encuentra en su fase haploide (asexual no patogénica) (Banuett y Herskowitz, 1996), a excepción de la cepa M3 A-791 (control positivo) que solo adquirió un color marrón después de un lapso de 8 días en el medio de cultivo (Figura 3).

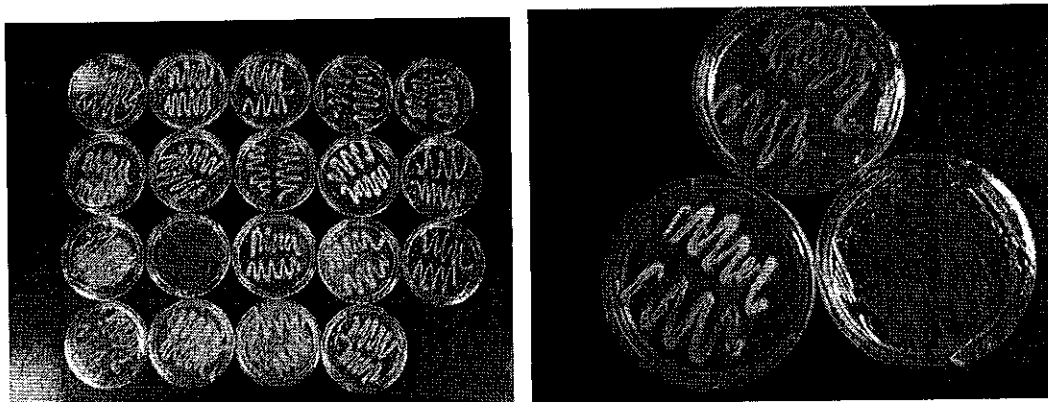


Figura 3. Aspecto del crecimiento de las cepas obtenidas de agallas de *U. maydis* en medio de cultivo PDA, las cuales presentan un crecimiento levaduriforme de color claro cremoso, excepto la cepa M3-A791 que es de color marrón después de 8 días.

6.2. Prueba de ureasa llevada acabo para diferenciación de *Ustilago maydis* respecto de las levaduras

Cuando se llevó acabo la prueba de ureasa para la diferenciación de microorganismo levaduriformes ascomycetes de basidiomycetes, en el caso de las primeras 20 cepas (Cuadro 3), la prueba resulto negativa; es decir no se apreció el cambio de color esperado (rojo magenta); por consecuencia, se consideró que dichas cepas correspondían a microorganismos ascomycetes, a pesar de haberse aislado de agallas típicas de huitlacoche de plantas experimentales en campo. La cepa M3 A-791 proveniente de la misma colección fue la única que resultó ser ureasa positiva (Cuadro 7), porque los tubos inoculados cambiaron de un color amarillo paja a rojo magenta, señal de un incremento en la alcalinidad del medio (Schaad, *et al.*, 2001) (Figura 4). Por esta razón y por la posterior identificación molecular con PCR, esta cepa que

fue la única que resultó ser *U. maydis* se por tanto, se consideró como nuestro control positivo (organismo basidiomycete). Respecto al control experimental (cepa AC), la prueba de ureasa también fue negativa, comportándose de la misma manera que el resto de las cepas analizadas de la colección.

Cuadro 7. Respuesta de las cepas obtenidas de agallas de *U. maydis* a la prueba de ureasa

Cepa	Color observado	Interpretación	Microorganismos según la evaluación
9	amarillo	negativo	Levadura
26	amarillo	negativo	Levadura
28	amarillo	negativo	Levadura
42	amarillo	negativo	Levadura
65	amarillo	negativo	Levadura
70	amarillo	negativo	Levadura
71	amarillo	negativo	Levadura
73	amarillo	negativo	Levadura
80	amarillo	negativo	Levadura
89	amarillo	negativo	Levadura
81	amarillo	negativo	Levadura
MH	amarillo	negativo	Levadura
MH'	amarillo	negativo	Levadura
MN	amarillo	negativo	Levadura
MN'	amarillo	negativo	Levadura
MNH	amarillo	negativo	Levadura
MNH'	amarillo	negativo	Levadura
MZC	amarillo	negativo	Levadura
MZC'	amarillo	negativo	Levadura
M3-A791*	rojo magenta	positivo	<i>U. maydis</i>
30G40	amarillo	negativo	Levadura
AC**	amarillo	negativo	Levadura

* Cepa de *U. maydis* utilizada como control positivo.

**Cepa experimental proveniente de huitlacoche fresco.

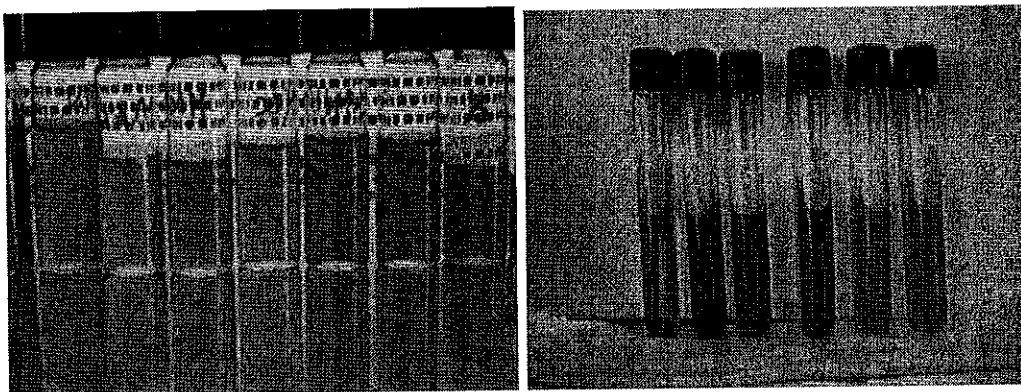


Figura 4. Resultados obtenidos con la prueba de ureasa donde se muestra el cambio de color amarillo paja en las cepas ureasa-negativas (ascomycetes) y el rojo magenta en la cepa ureasa-positiva, indicando que la cepa M3-A791 corresponde a un organismo basidiomycete; en esta caso *U. maydis*.

6.3. Efecto antagonista de microorganismos tipo levadura sobre *Ustilago maydis*.

Los resultados obtenidos con la prueba de ureasa, indican que la mayoría de las cepas incluidas en el estudio era organismos pertenecientes a los ascomycetes y solo la cepa M3-A791 resultó ser el hongo basidiomycete *U. maydis*, por lo señalado anteriormente. Los resultados del efecto antagonista entre *U. maydis* y las dos cepas de levaduras utilizadas (cepas 71 y 81) fue muy claro, ya que ambas cepas de levaduras mostraron tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *U. maydis*, porque limitaron su crecimiento en el medio de cultivo PDA. en la Figura 5 se ilustra como las levaduras estriadas en la periferia de la caja petri, limitaron el crecimiento de *U. maydis* el cual fue estriado estriado al centro de la misma. Después de ocho días de mantener las cajas con ambos organismos, se observó el predominio de las levaduras. Estos

resultados concuerdan con lo reportado por Mari y Guizzardi (1998) quienes señalan que las levaduras pueden tener efectos negativos sobre otros microorganismos por competencia, producción de metabolitos o parasitismo. Por otro lado, Polonelli y Morace (1986) también reportaron que las levaduras tiene un efecto antagónico contra microorganismos procariontes y eucariontes. Este comportamiento en condiciones de laboratorio puede explicar en parte, la razón por la cual al tratar de aislar de huitlacoche cepas de *U. maydis*, lo que predomina en esta estructura son organismos ascomycetes (levaduras). Del mismo modo, al tratar de purificar dichos aislamientos en condiciones de laboratorio, el desarrollo de las levaduras es mayor que el de *U. maydis*, pudiendo eliminar a éste durante los procesos de purificación; y que debido al aspecto similar de las colonias de ambos tipos de organismos desarrolladas en medio de cultivo (PDA), al inicio resulta difícil asegurar que el organismo finalmente purificado sea el hongo *U. maydis*.



Figura 5. Efecto antagónico de los microorganismos tipo levadura (cepas 71 y 81) sobre *U. maydis*. Nótese que en los puntos de intersección donde coincidieron las cepas de levadura y de *U. maydis* predominó el desarrollo abundante de las levaduras sobre *U. maydis* después de 8 días de crecimiento en PDA en condiciones de laboratorio.

6.4. Tipificación mediante RAPDs de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

Mediante esta técnica solamente el iniciador Roth A-13 logró reconocer y amplificar 19 de las 20 cepas de levaduras consideradas en el trabajo; logrando un perfil de bandas de DNA claras y algunas de ellas polimórficas (Figura 6). El resto de los iniciadores (34) no proporcionaron información útil, debido a que no hubo amplificación en el total de las cepas con cada uno de ellos, por lo que se decidió no considerarlos para la diferenciación. Sin embargo, el perfil de bandas detectado con el iniciador A-13, sugirió que las cepas correspondían a más de un organismo; o bien, a un grupo de organismos con amplia variabilidad genética. Debido a que se esperaba que las cepas correspondieran al mismo organismo; es decir, pocas bandas de DNA polimórficas, se procedió a codificar la información molecular y construir el

dendrograma correspondiente (Figura 7). La interpretación de este indicó la existencia de organismos diferentes; en la Figura 7, se puede apreciar la formación de distintos grupos según el valor del coeficiente de similaridad que se considere. Con un valor de 0.60, las cepas forman dos bloques principales, el grupo A que contiene las cepas 26, 28, 42, 70 y 80; mientras que el resto de ellas se mantuvieron en el grupo B (cepas 9, 65, 71, 73, 81, 89, MH, MH', MN, MN', MNH, MNH', MZC y MZC'). Considerando un valor de similaridad de 0.78, las 19 cepas de levaduras se agrupan en 7 grupos diferentes; el grupo 1 contiene a las cepas 28 y 80, el grupo 2 a las cepas 42 y 70, el 3 solo contiene a la cepa 26, en el grupo 4 se ubican las cepas 9, 71, 81, MN, MN', MNH y MZC, el grupo 5 se representó por las cepas 65, 73, 89, MH' y MNH'; mientras que los grupos 6 y 7 fueron representados por las cepas MH y MZC' respectivamente. Esto nos sugiere la presencia de más de una especie dentro del conjunto de cepas aisladas del huítlacoche; sobre todo si se toma en cuenta que casi nula funcionalidad de los iniciadores aleatorios utilizados en la técnica de RAPDs.

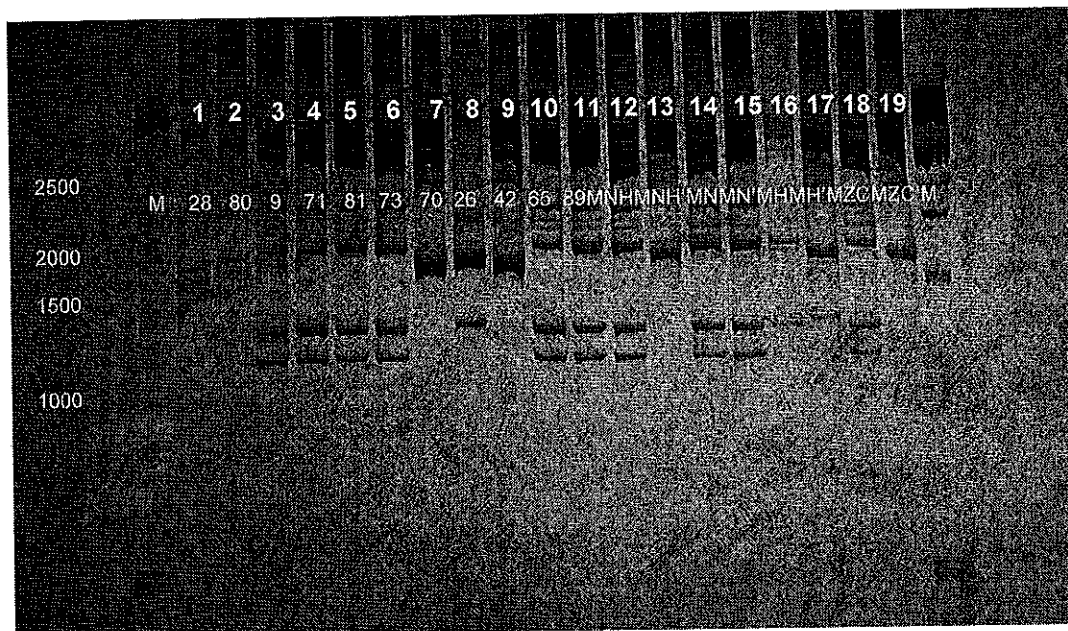


Figura 6. Perfiles de bandas obtenidas con el iniciador ROTH A-13 en 19 cepas de levaduras aisladas de huitlacoche. Las cepas de los carriles 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 14, 15, presentan perfiles de bandas similares; por lo que pudieran representar un mismo organismo. Las cepas de los carriles 7, 8, 9 y 13 muestran perfiles similares entre sí, pero diferente al anterior; mientras que resto de las cepas muestra otros perfiles distintos.

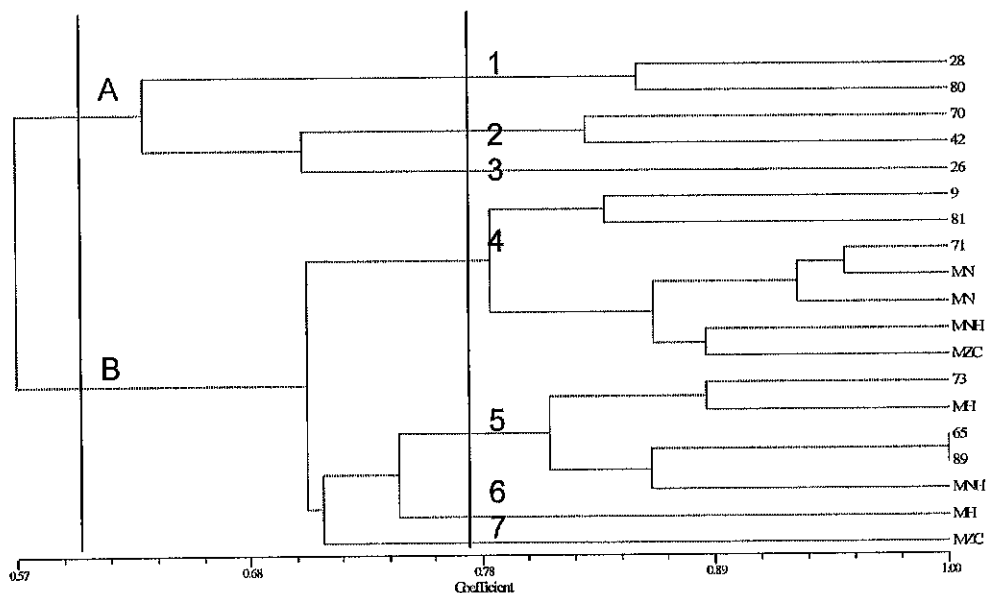


Figura 7. Dendrograma construido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente Jaccard utilizando la información del iniciador Roth A-13.

6.5. Caracterización mediante ISSR de microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

A diferencia de los iniciadores aleatorios y con la finalidad de apreciar la posible relación o divergencia entre las cepas de levaduras aisladas del huitlacoche, la técnica de ISSR resultó de bastante utilidad. Aún cuando solamente 3 de los 5 iniciadores utilizados mostraron información útil, ya que amplificaron todas las cepas y mostraron polimorfismos claros. Con el iniciador (GA)8YC y (AC)8YG se lograron amplificar alrededor de 15 bandas con cada uno; mientras que con el iniciador (CA)7DBDA se detectaron 19 bandas diferentes (datos no mostrados). Al analizar estadísticamente esta información

y realizar el dendrograma correspondiente (Figura 8), se conformaron 4 grupos de organismos con un mínimo parecido molecular entre ellos, determinado por el valor de 0.30 en la gráfica respectiva. Aún cuando el máximo valor de similitud obtenido en el análisis fue de 0.65, nos permite presuponer que efectivamente las cepas de levaduras bajo estudio pertenecen a grupos o especies diferentes, ya que si el valor de similitud hubiera sido mayor, indicaría que las cepas tendrían mayor relación genética entre ellas. Este comportamiento que fue similar al obtenido con la técnica de RAPDs, sustenta con mayor probabilidad la hipótesis de que existen más de un organismo de distinta especie en las agallas de huitlacoche.

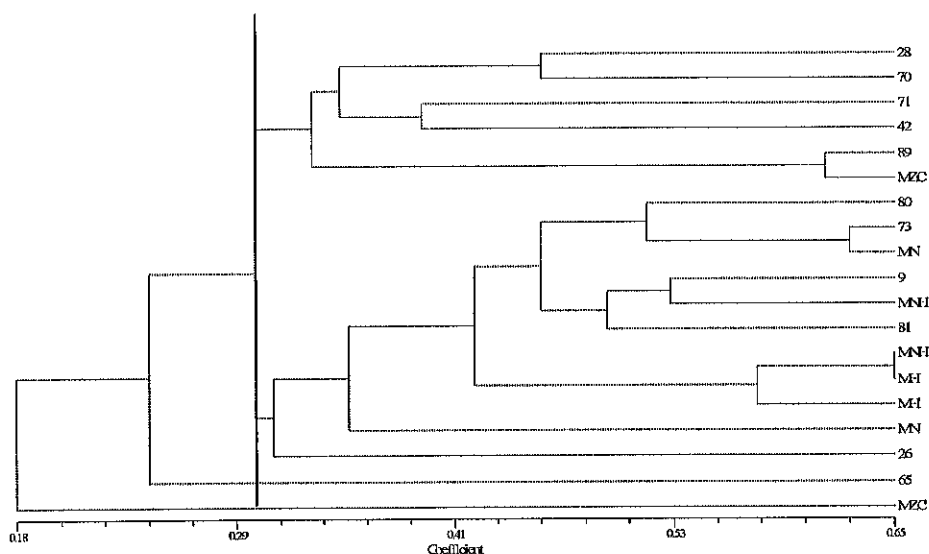


Figura 8. Dendrograma construido a partir de los ISSR con las cepas aisladas de agallas de huitlacoche.

6.6. Identificación de *Ustilago maydis* con iniciadores específicos.

Con la finalidad de corroborar que solo la cepa M3-A791 correspondía a *U. maydis* a diferencia del resto de las cepas empleadas, se utilizaron iniciadores específicos para PCR actualmente utilizados para identificación molecular de *U. maydis*. La prueba se extendió, además de las cepas referidas en el Cuadro 3, con DNA de teliosporas de la agalla de huitlacoche obtenida en el mercado local. Cabe resaltar que este DNA se obtuvo de un conjunto de teliosporas procesadas directamente de la agalla y que es diferente a la cepa purificada a partir de esta misma estructura y referida en el Cuadro 3 como la cepa AC. Como resultado de la PCR respectiva, solamente se obtuvo el fragmento esperado de 900 pb, tal como lo señala Xu, *et al.*(1999) en la cepa M3-A791 que se había venido considerando como control positivo, además del DNA de las teliosporas del huitlacoche procedente el mercado local DNA (Figura 9). El resto de las cepas analizadas no mostró amplificación alguna, aún cuando se ensayaron diferentes condiciones de reacción en la PCR.

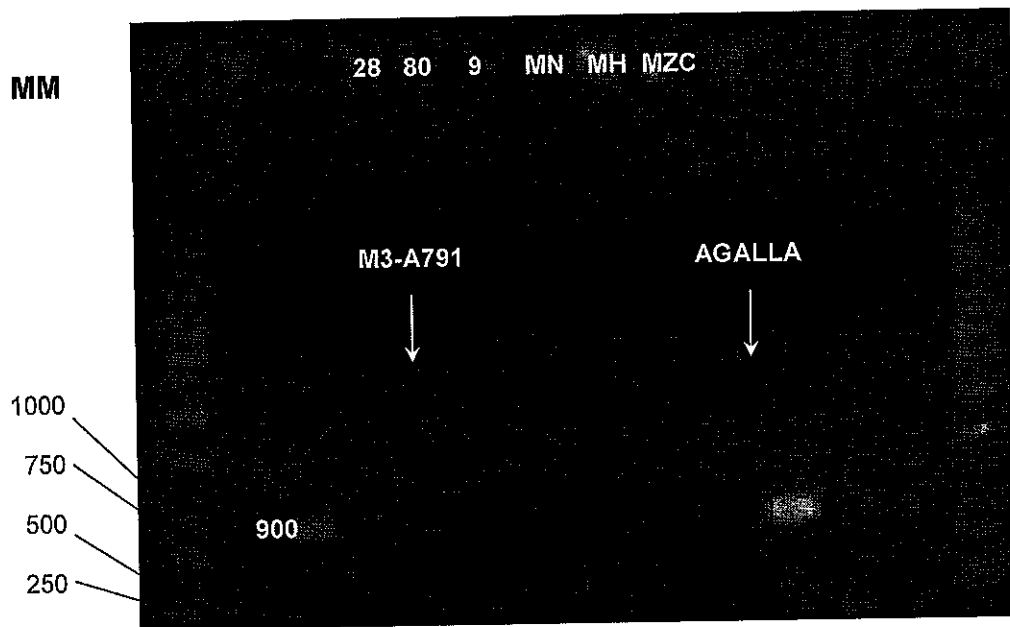


Figura 9. Fragmento de 900 pb amplificado con DNA de la cepa M3-A791 y teliosporas tomadas directamente de una galla comercial; el fragmento indica que las cepas corresponden a *U. maydis*.

6.7. Amplificación de ITS de los microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

Con la finalidad de conocer a que tipo de microorganismo correspondían las cepas que en todas los experimentos resultaron negativas para *U. maydis*, la PCR realizada con los iniciadores ITS5 e ITS4 (Figura 10) amplificó un fragmento de aproximadamente 625 pb (Figura 11), en las 19 cepas seleccionadas. La secuenciación de la información genética contenida en dicho fragmento, sirvió para la identificación de las cepas aisladas de huitlacoche pero que no resultaron ser *Ustilago maydis*.

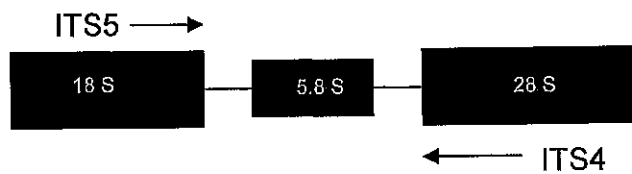


Figura 10. Región del DNA ribosomal amplificada con los iniciadores ITS5 e ITS4. En dicha Figura se muestra la región reconocida por cada uno de los iniciadores.

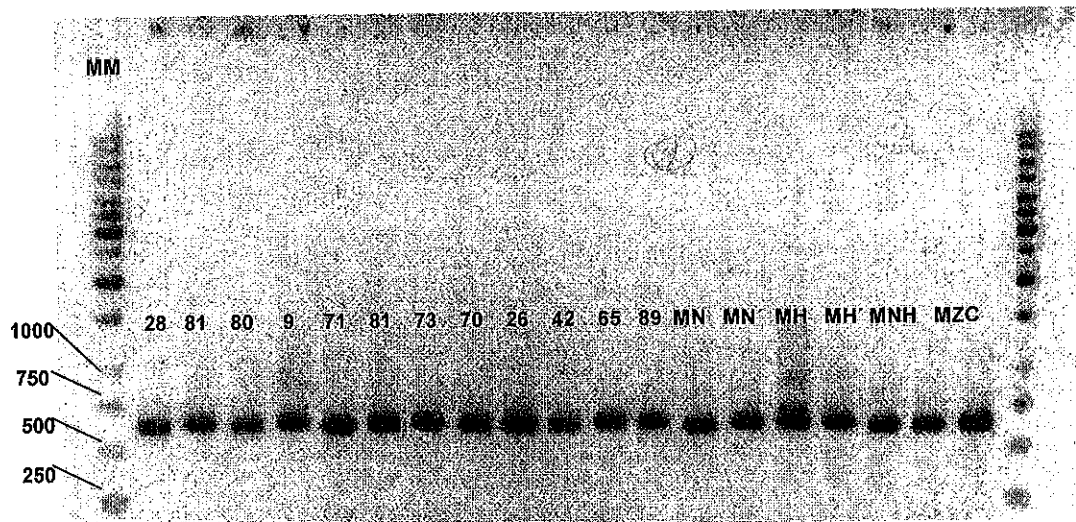


Figura 11. Fragmento aproximado de 625 pb amplificado con ITS5 e marcador utilizado fue de 1 kb (Marca Fermentas).

6.8. Secuenciación del fragmento de ITS obtenido con los iniciadores ITS5 E ITS4

El producto de la amplificación de ITS que aparentemente es del mismo tamaño, se secuenció y comparó con las secuencias reportadas en el GenBank con ayuda del programa Blast. En el Cuadro 8, se muestra el número de accesión y microorganismo con el que se identificó cada una de las cepas de levadura en estudio. Este resultado indicó que las cepas de levaduras obtenidas y purificadas a partir de agallas de *U. maydis*, pertenecen a dos géneros y 3 especies distintos de levaduras que coexisten en la agalla de huitlacoche mediante algún tipo de relación benéfica o dañina para *U. maydis*. La aparición de estos microorganismos en cepas aisladas a partir de agallas de huitlacoche de apariencia sana, suponen que en algún momento del ciclo de vida de *U. maydis* coinciden ambos microorganismos, ya sea en el suelo, restos vegetales o la planta de maíz, esta situación tiene una alta probabilidad de ocurrir pues las levaduras suelen habitar en restos vegetales, agua, flores y frutos, y algunas están asociadas a insectos; pero el suelo es el principal reservorio de estos microorganismos (Deak y Beuchat, 1996), esto explica de algún modo que las levaduras, en este caso del género *Pichia* y *Candida* aparezcan en medio de cultivo cuando se pretende asilar a *U. maydis* colectado de agallas de apariencia sana.

Cuadro 8. Microorganismos asociados a las agallas de huitlacoche, identificados con la secuenciación del fragmento obtenido con el fragmento de los ITS5 e ITS5.

CLAVE DE LA CEPA	MICROORGANISMO	NUMERO DE ACCESIÓN GENBANK
65	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ680842.1
42	<i>Pichia guilliermondii</i>	AM158924.1
26	<i>Candida railenensis</i>	AY528672.1
70	<i>Candida quercitrusa</i>	AM158924
71	<i>Pichia guilliermondii</i>	AM160625
81	<i>Candida railenensis</i>	AY528672
28	<i>Candida quercitrusa</i>	AM158924.1
80	<i>Candida railenensis</i>	AB278160
9	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ683005
89	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ680842.1
73	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ680842.1
MNH	<i>Pichia guilliermondii</i>	AM160625
MNH'	<i>Candida railenensis</i>	AY528672.1
MN	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ683005
MN'	<i>Candida railenensis</i>	AY528672.1
MH	<i>Candida railenensis</i>	AY528672.1
MH'	<i>Candida railenensis</i>	AY528672.1
MZC	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ663479
MZC'	<i>Candida railenensis</i>	AY528672.1

VII. DISCUSIÓN GLOBAL

El hongo fitopatógeno *U. maydis* causante del carbón común del maíz, es un microorganismo que puede ser fácilmente cultivado en medio de cultivo formando colonias tipo levadura (Kronstad y Leong, 1988 y Wang, Holden y Leong, 1987), que se forma por células haploides que se reproducen por gemación y constituye la forma no patogénica del hongo (Banuett y Herskowitz, 1996). Este comportamiento en medio de cultivo puede constituir un factor de riesgo cuando se desea obtener cultivos puros de *U. maydis* para la producción comercial de huitlacoche, ya que otros microorganismos tienen un tipo de crecimiento similar, como es el caso de las levaduras, cuyas colonias en medio de cultivo son similares a las de *U. maydis* siendo de color cremoso a amarillo y con el tiempo tienden a un color marrón (www.doctofungus.edu).

Las levaduras son microorganismos que se encuentran tanto en plantas, como en el suelo (Deak y Beuchat, 1996), siendo este último su principal reservorio, por lo que puede ser sumamente fácil que ocurra una contaminación de las agallas de *U. maydis* en campo, situación que de presentarse, cuando se aísla *U. maydis* en medio de cultivo, puede crecer junto con algunas levaduras, dado que tienen un aspecto muy similar en este tipo de medios y por tanto no obtener cepas puras de *Ustilago maydis*.

La prueba de ureasa es una herramienta rápida para diferenciar un microorganismo ascomycete respecto de un basidiomicete, en el caso de *Ustilago maydis*, el cual es un organismo basidiomiceto, el cambio del reactivo a un color rojo magenta indica que la prueba de ureasa es positiva Schaad, (2001). Al realizar esta prueba en las primeras etapas del proceso de purificación de agallas de huitlacoche, permite seleccionar las cepas que resulten positiva y descartar las que resulten negativas, asegurando aislar *U. maydis* que es el hongo de interés.

Las levaduras pueden tener un efecto antagónico contra algunos hongos por competencia, producción de metabolitos o parasitismo (Deak y Beuchat, 1996). Su crecimiento rápido le da la capacidad de producir enzimas hidrolíticas (β -1,3 glucanasa) y polímeros extracelulares (Mari y Guizzardi, 1998) que les da un efecto "Killer" sobre otros organismos por la producción de toxinas tal, como lo evaluaron Polonelli y Morace (1986). Las cajas petri sembradas con la cepa de *Ustilago maydis* en competencia con la cepa 71 y 81, mostraron un efecto antagónico, predominando las cepas 71 y 81 en el medio de cultivo, lo cual indicó que de alguna forma existe un efecto antagónico supresor de las levaduras sobre *U. maydis*.

Como resultado de la secuenciación se identificaron dentro de los 19 aislamientos obtenidos a partir de agallas de *U. maydis*, principalmente a *Pichia guilliermondii*, *Candida raillensis* y *C. quercitrusa* que son levaduras y su presencia en medios de cultivo con *U. maydis* tienen un efecto antagónico

sobre el crecimiento de este, situación preocupante ya que *U. maydis* es un hongo tolerado y en los últimos años la producción artificial de inóculo ha tomado importancia para la producción comercial de huitlacoche.

Si bien no existen reportes de que las levaduras identificadas tengan un efecto antagónico sobre *U. maydis*, si hay reportes en relación al efecto de especies de *Pichia* y *Candida* sobre otros microorganismos como por ejemplo: Peterson y Schnurer (1995) reportaron que las levaduras *Pichia anomala*, *P. guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae* inhiben el crecimiento de *Penicillium roqueforti*. Del mismo modo *A. flavus* restringe su crecimiento cuando se encuentra en competencia en medio de cultivo con *P. guilliermondii*. Las cepas US-7 y 101 de *Pichia guilliermondii* reducen la infección de tallos de jitomate atacados por *Botrytis cinerea* (Salgikarias, et al., 2005). Las especies del género *Candida* también tienen un efecto antagónico contra algunos hongos postcosecha, por ejemplo la cepa *Candida sake* reduce la pudrición causada por *P. expansum* (Viñas, 1999), mientras que la cepa *C. oleophila* reduce los daños causados por la "mole gris" en frutos de pera con heridas ligeras (Mari y Guizzardi, 1998). Estas evidencias respaldan la posibilidad de que *Pichia guilliermondii* y las especies de *Candida* spp pueden llegar a tener un efecto antagónico sobre *U. maydis* ya sea por competencia por espacio y nutrientes, por efecto de toxinas o parasitismo directo.

Es muy importante este conocimiento dado que pueden llevar al fracaso los intentos de producción masiva de inóculo de *U. maydis* para la producción

comercial de huitlacoche, tanto como al momento de llevar acabo la inoculación en campo sobre plantas de maíz, como en la etapa de preparación e incremento del inóculo obtenido de cepas colectadas directamente en campo, ya que tanto *P. guilliermondii* y *Candida railenensis* son levaduras que pueden estas habitando en las agallas de "huitlacoche", ya que se encontraron en cepas de *Ustilago maydis* crecidas *In Vitro* provenientes de agallas frescas y sin abrir colectadas en campo.

VIII. CONCLUSIONES

- Los microorganismos tipo levadura aislados de agallas de huitlacoche colectadas en campo corresponde a las especies *Candida railenensis* (26, 81, MNH', MN', MH, MH'y MZC') *C. quercitrusa* (70, y 28) y *Pichia guilliermondii* (65, 42, 71,9, 89, 73, MNH, MN y MZC).
- Las levaduras identificadas, asociadas a las agallas de huitlacoche, mostraron un efecto antagónico no reportada anteriormente, sobre el crecimiento de *U. maydis*, cuando se sembraron por estría cruzada en medio de cultivo, predominado estas después de mantener el cultivo por ocho días.
- El tipo de crecimiento levaduriforme de *U. maydis* en medio de cultivo es un factor de confusión en la purificación de cepas para la producción de inóculo.
- La prueba de ureasa es una técnica bioquímica rápida para poder diferenciar *U. maydis* de levaduras cuando el hongo se desea purificar en medio de cultivo para la producción masiva de inóculo y el cultivo comercial de huitlacoche.

- Las técnicas moleculares mediante el uso de iniciadores específicos (5'-GAA CCT TTC TGG CCT CCT TT- 3' y 5'- CCT TGG TTT CCG TTC CGT AC- 3')son una herramienta muy importante para la identificación de *U. maydis*.
- Cepas almacenadas por periodos largos en aceite mineral aisladas de agallas cerradas de huitlacoche de aspecto sano, pueden estar contaminadas con levaduras, por lo que al reiniciar su crecimiento en medio de cultivo pueden llegar a ser eliminadas por la presencia de éstas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Babu, R. M., Choffe, K. and Saville, J. B. 2005. Differential gene expression in filamentous cells of *Ustilago maydis*. *Corr. Genet.* 47: 316-333.
- Banueff, F. and Herskowitz, I. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Developmental* 122: 2965-2976.
- Basse, W. C. and Farfing, W.J. 2006. Promoters their regulation in *Ustilago maydis* and other phytophagetic fungi. *FEMS Microbiol Lett* 254: 208-216.
- Chun, L. Y., Korl, B. A., Fahima, T. and Nevo, E. 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Mol. Bio. Evol* 21 (6): 991-1007.
- Church, M. G. 2006. El genoma personalizado. *Investigación y Ciencia*. Pp14-22.
- Deak, T., and Beuchat, L.R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeast*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Edel, V. 2005. *Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview*. Cedex France.
- Gold, S. E. *et al.* 2005. Genomic and genetic Analysis of Plant parasitism and defence. *The American Phytopathological Society* 30-49 pp.
- Gold, E. S., Brogdon, M. S., Mayorga, E. M. and Krunstad, W. J. 1997. The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *The Plant Cell* 9: 1585-1594.

Gomes, A. E., Kasuya, M. M. C., Barros, G. E., Borges, C. A. and Araújo, F. E. 2002. Polymorphism in the inter transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology* 25: 477-483.

Gómez, V. S. 2006. Caracterización y Diferenciación molecular de larvas de mosca de la fruta del género *Anastrepha*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo.

Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos Micología básica y aplicada. UNAM, Fondo de Cultura Económica.

Kahnmann, R. and Kamper, J. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relate to pathogenic development. *New Phytologist* 164: 31-42.

Kronstad, J. W. and Leong, S. A. 1989. Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 978-982.

Kronstad, J. W. and Staben, C. 1997. Mating type in filamentous fungi. *Annu. Rev. Genet.* 31: 245-276.

Larena, I. *et al.* Design of a primer for ribosomal DNA inter transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75: 187-194.

Lee, N., and Kronstad, W. J. 2002. *ras2* controls morphogenesis pheromone response and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* 1 (6): 954-966.

Mahlert, M., Leuclek, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. 2005. Rac1 and cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 59 (2): 567-578.

Manulis, S., Kogan, M. and Yephet, B. 1993. Use of the RAPD Technique for Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* from Carnation. *Phytopathology* 84: 98-101.

Mari, M. and Guizzardi, M. 1998. The Postharvest Phase: Emerging Technologies for the Control of Fungal Diseases. *Phytoparasitica* 26: 59-66.

Menzies, J.G., Bakkern, G. Matheson, F., Procunier, J. D. and Woods, S. 2002. Use of inter simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphism to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology* 93: 167-175.

Moreno, V. S. 2001. Análisis de resultados en la caracterización molecular. En: Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. González, A. F., y Pita, V. J. M. (Eds) INEA Esc. Univ. De Ingeniería Técnica Valladolid.

Müller, P., Katzenberger, D. J., Loubradou, G. and Kahmann, R. 2003. Guanylyl nucleotide exchange factor Sq12 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* 2 (3): 609-617.

Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A. and Feldbrugge, M. 2003. Mating and pathogenic development of smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen activated protein kinase cascade. *Eukaryotic Cell*. 2 (6): 1187-1199.

Munkacsí, A. B., Kawakami, S., Pan, J. J., Lee, K., Stoxen, S., Hong, J. and May, G. 2006. Genome-Wide assessment of tandem repeat markers for biogeographical analysis of corn smut fungus *Ustilago maydis*. Molecular Ecology note 6: 221-223.

Orberá, R. T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam. Micol. 21: 15-19.

Polonelli, L. y Morace, G. 1986. Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. Journal of Clinical Microbiology 24: 866-869.

Sacadura, T. N. and Saville, J. B. 2003. Gene expresión and EST analices of *Ustilago maydis* germination teliospore. Fungal Genetics and Biology 40: 47-64.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSH)

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3a APSPRESS pag 47.

Sgarlata, C. and Perez, M. J. 2005. The cdc25 phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete yeast *Ustilago maydis*. Molecular Microbiology 58 (2): 1482-1496.

Sharma, S., Rustgi, S., Balyan, S. H., and Gupta, P. K. 2006. Inter Transcribed Spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild Barle and their comparison with ITS sequences in common wheat. Barley Genetics Newsletter vol. 32.

Sneath, P. H., and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification. WH Freeman and Company.

Torres, L. M. E. y Moreno V. S. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. En: Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. González, A. F., y Pita, V. J. M. (Eds) INEA Esc. Univ. De Ingeniería Técnica Valladolid.

Valadez, M. E. y Kahl, G. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas (Teoría y protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa, México.

Villanueva, V. C. 1995. Estudio de la reacción del maíz al carbón común o huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias especialista en Genética. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México.

Wang, J., Holden, D. and Leong, S. 1988. Gen Transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Proc. Natl. Acad. Scri. USA 85: 865-869.

Wickerham, J. L. 1966. Validation of the species *Pichia guilliermondii*. Juornal of bacteriology 63: 449.

Wolfe, D. A. 2005. ISSR Techniques for evolucionary biology. Methods in enzymology 395: 134-144.

Xu, L. M., Melchinger, E. A. and Lübberstedt, T. 1999. Species-Specific Detection of the Maize Pathogens *Sporisorium reiliana* and *Ustilago maydis* by Dot Blot Hybridization and PCR-Based Assays. Plant. Dis. 83: 390-395.

Zahiri, R. A., Babu, R. M. and Saville, J. B. 2005. Differential gene expression during teliospore germination in *Ustilago maydis*. Mol. Gen. Genomic 275: 394-403.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeated (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genome 20: 176-183.

www.doctrofungus.edu. Pagina de la web consultada el 20 de diciembre del 2005.