



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

OBTENCIÓN DE INÓCULO DE HUITLACOCHÉ
(*Ustilago maydis* (DC) Corda) EN MEDIO LÍQUIDO

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS:
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

PRESENTA:

ALEJANDRO MARTÍNEZ FLORES



Ciencia y Tecnología Agroalimentaria



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Edo. de México, Julio de 2009



USO EXCLUSIVO
DENTRO DE LA
BIBLIOTECA



BIBLIOTECA AGROINDUSTRIAL UACH.

OBTENCIÓN DE INÓCULO DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (DC)

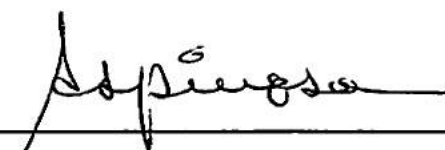
Corda) EN MEDIO LÍQUIDO

Tesis realizada por ALEJANDRO MARTÍNEZ FLORES bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN:

CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESOR:

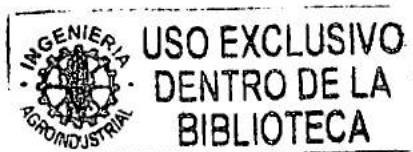


DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO

ASESOR:



DR. MARCELO ACOSTA RAMOS



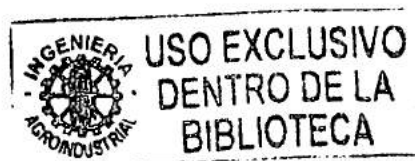
000098

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Nombre Martínez Flores Alejandro
Lugar de nacimiento Sn. Lorenzo Toxico, Ixtlahuaca, Edo. Mexico.
Domicilio actual Progreso de Obregón. Hidalgo, México.
e-mail alex002ing@gmail.com

FORMACIÓN ACADÉMICA

2000-2005 **Licenciatura.** **Ingeniería** **Agroindustrial.**
Departamento de Ingeniería Agroindustrial.
Universidad Autónoma Chapingo
CEDULA: 5005009



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por darme la oportunidad de culminar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría, así como el financiamiento de la investigación a través del proyecto 8250855 "Producción controlada e intensiva de huilacoche (*Ustilago maydis* Cda) y alternativas para su manejo en postcosecha".

Al Banco Santander por su apoyo financiero a través de la Beca de Movilidad Santander Universia 2008-1, para la realización de la estancia de investigación en la UPIBI-I.P.N. A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del I.P.N. por las facilidades otorgadas para el desarrollo de la presente investigación.

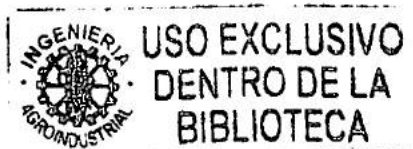
Al Dr. Teodoro Espinosa Solares por su invaluable apoyo y orientación en la dirección de esta investigación.

Al Dr. Enrique Durán Páramo por darme la oportunidad de realizar la investigación en la UPIBI-IPN, así como su importante asesoría y apoyo para la culminación de la investigación.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por su asesoría y apoyo durante la investigación.

A la Dra. Anja Drews por sus atinadas aportaciones al trabajo realizado.

Al Ing. Cesar Agustín Jiménez Sierra por toda la ayuda brindada durante el trabajo de laboratorio.



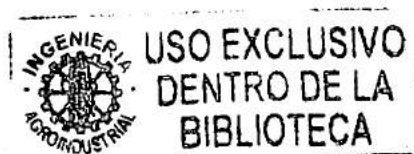
DEDICATORIA

Con todo mi amor a quienes confían plenamente en mí y me han ofrecido su amor, comprensión y apoyo, mis padres:

Isidoro Martínez Cruz y Natalia Flores Nicolás

A mis hermanos y amigos: Patricia, Rosalba y José Roberto, por su cariño y apoyo que siempre me han ofrecido.

A Jazmín por ofrecerme su amor y estar conmigo en todo momento.



CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN Y ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.	6
2.1 EL PATÓGENO <i>Ustilago maydis</i>	6
2.1.1 Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	8
2.1.2 Síntomas de la enfermedad.....	15
2.1.3 Control de la enfermedad e inhibición del crecimiento <i>In Vitro</i>	17
2.1.4 Pérdidas en la producción de maíz ocasionadas por <i>U. maydis</i> . .	20
2.1.5 Importancia de <i>U. maydis</i> para producción metabolitos.	21
2.1.6 Bioquímica de <i>U. maydis</i>	22
2.2 USO ALIMENTICIO DEL HUITLACOCHÉ.	23
2.2.1 Consumo de huitlacoche.	24
2.2.2 Recolección del huitlacoche y comercialización.	25

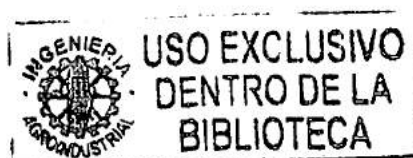
2.3	PRODUCCIÓN COMERCIAL DE HUITLACOCHÉ.....	31
2.3.1	Avances en la producción de huitlacoche.....	31
2.3.2	Rendimiento de huitlacoche.	35
2.3.3	Producción de inóculo de huitlacoche.	37
2.4	SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	39
2.4.1	Sistema de cultivo en lote o discontinuo.....	40
2.4.2	Efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento celular.....	43
2.4.3	Cinética de consumo de sustrato.....	44
2.4.4	Sistema de cultivo alimentado.....	46
2.4.5	Sistema de cultivo continuo.....	47
2.4.6	Cinética de crecimiento de <i>Ustilago maydis</i>	47
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1	Aislamiento de <i>Ustilago maydis</i>	53
3.2	Medios de cultivo utilizados.....	54
3.3	Esporulación en matraces agitados.....	55
3.4	Esporulación en biorreactor.....	55
3.5	Métodos analíticos.....	57
3.5.1	Conteo directo de esporidias de <i>U. maydis</i>	57
3.5.2	Estimación de biomasa por peso seco.....	58

3.5.3	Estimación de glucosa residual.	59
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	62
4.1	Aislamiento de esporidias de U. maydis.....	62
4.2	Crecimiento de esporidias de U. maydis en matraces agitados.....	63
4.3	Efecto del medio de cultivo sobre la morfología de U. maydis en matraces agitados.	70
4.4	Cinética de crecimiento de U. maydis en Biorreactor.....	75
4.5	Cálculo de parámetros cinéticos del crecimiento de U. maydis	78
4.6	Confrontación de los resultados y los trabajos de inoculación.	81
5.	CONCLUSIÓN.....	82
6.	BIBLIOGRAFIA.....	84
7.	ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Toxicidad de dos fungicidas al crecimiento de <i>U. maydis</i> determinado por el incremento en el número de esporidias.....	19
Cuadro 2. Composición proximal de Huitlacoche en base seca (b.s.).	28
Cuadro 3. Ejemplo de la composición proximal (% b.s.) de huitlacoche producido por la crusa de diferentes aislamientos.....	28
Cuadro 4. Composición de Huitlacoche producido sobre híbridos (% b. s.).....	29
Cuadro 5. Contenido de ácidos grasos en huitlacoche producidos sobre algunos híbridos (mg/g, base seca).....	30
Cuadro 6. Formas de producción de esporidias de <i>U. maydis</i> usadas como inóculo para inducir el carbón común (hojas) o evaluar la producción de huitlacoche.	37
Cuadro 7. Composición del medio Grimm-Allen. Todos los productos de la marca J.T. Baker®	54
Cuadro 8. Diluciones para la construcción de la curva patrón de glucosa.	60
Cuadro 9. Comparación de medias de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y esporidias ($\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$) en tres medios de cultivo, en las primeras horas de fermentación, en matraces agitados de 500 mL con 250 mL de medio.	65
Cuadro 10. Valores de velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}), coeficiente de rendimiento ($Y_{x/s}$), velocidad volumétrica de consumo	

de sustrato (r_s) y tiempo de duplicación (t_d), de la producción de esporidias en matraz y biorreactor, en los tres medios de cultivo, estimados a partir de la biomasa ($g \cdot L^{-1}$).80



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Agallas o tumores originadas por la infección natural de <i>Ustilago maydis</i> en un maíz criollo del valle de Toluca, México. En mazorca (a) y en espiga (b).....	7
Figura 2. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> , mostrando las dos etapas de su ciclo. Fuente: Modificado de Casselton y Olesnický (1998).....	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> ilustrando las partes de la planta. Fuente: Modificado de Banuett (1992).....	10
Figura 4. a) Morfología de las esporidias de <i>U. maydis</i> en medio de cultivo líquido. Fuente: Steinberg y Perez-Martín (2007). b) Esquema de la división de la esporidia de <i>U. maydis</i> , en azul la posición del núcleo. Fuente: Banuett y Herskowitz, 2002.....	11
Figura 5. Crecimiento en planta. A) proliferación de la hifa. B) Fragmentación de la hifa, 9 días después de la inoculación en hoja de maíz con la mezcla de FB1 y FB2. Fuente: Basse y Steinberg, 2004.....	13
Figura 6. A) Clorosis en el tejido de la hoja (flecha), la imagen corresponde a un imagen 2.5 días después de la inoculación. B) Durante las primeras 24 h de inoculación, las esporidias se mantienen en la hoja en grupos, forman el tubo de conjugación e inmediatamente se fusionan. C) Muestra la presencia de antocianina sobre la nervadura de la hoja, 2.5	

días después. D) Muestra una parte del tejido pigmentado, células rojo purpura. a- antocianina, n-núcleo de la célula. Fuente: Banuett y Herskowitz, 1996.....	15
Figura 7. A) Pequeños tumores en la superficie de la hoja, después de 6 días, mostrando una distribución uniforme. B) Hojas con agrupamiento de tumores a lo largo de la nervadura de la hoja. Fuente: Banuett y Herskowitz, 1996.....	16
Figura 8. Agallas producidas por <i>U. maydis</i> llamadas huitlacoche usadas como alimento humano.....	24
Figura 9. Formas de comercialización de huitlacoche fresco, entero y desgranado.....	27
Figura 10. a y b) Porcentaje de severidad de las agallas de huitlacoche a diferentes días de inoculación, controlando la polinización quitando espiga o sin eliminarla o usando híbrido estéril, c y d) producción de huitlacoche (g/mazorca) controlando polinización por eliminación de espiga o usando híbrido estéril. Fuente: dU Toit y Pataky, 1999b.....	34
Figura 11. Viabilidad de esporidias de algunos aislamientos de <i>U. maydis</i> a 25 °C, suspendidas en agua, sembradas en PDA para conteo de UFC. Fuente: Guevara-Lara <i>et al.</i> (2000).	39
Figura 12. Curva típica de crecimiento celular. Fuente: Doran (1998).	41
Figura 13. Relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato limitante del crecimiento en un cultivo celular. Fuente: Doran (1998).	44

Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>U. maydis</i> y producción de L-lisina. Fuente: Sánchez-Marroquí et al., (1970).	48
Figura 15. A) Promedio de peso seco de células de <i>U. maydis</i> cultivadas en medio con diferente concentración de Fe ³⁺ . Fuente: Budde y Leong (1989). B) Cinética de crecimiento de esporidias de <i>U. maydis</i> , sobre caldo de papa-elote-sacarosa, con y sin Con A, Fuente: Saavedra et al. (2003).	49
Figura 16. Efecto de varias fuentes de carbon sobre el crecimiento celular de <i>U. maydis</i> y la actividad PAL. Fructosa, Galactosa, Glucosa, Manosa, Lactosa, Maltosa, Sucrosa, Ácido cítrico, Ácido malico, Ácido succínico. Las células fueron crecidas por 36 h en medio mínimo compuesto de 20 mM NH ₄ NO ₃ , y solución basal de sales con cada fuente de carbón al 2%. Fuente: Kim et al. (2001).	51
Figura 17 Cinética de crecimiento de <i>U. maydis</i> para la producción del metabolito denominado sideroforo. Fuente: Drews y Kraume (2002).	52
Figura 18.Aspecto de las mazorcas de maíz infectada naturalmente con <i>U. maydis</i> , antes y después de ser colectadas.	53
Figura 19.Matracas de 500 mL con medio de cultivo estéril antes de inoculación, y matraces de 250 mL con esporidias crecidas 24 h usadas para inocular, manejado en condiciones asépticas.	55
Figura 20. A) Preparación del vaso del biorreactor con medio YPD antes de su de su esterilización en autoclave. B) Biorreactores en con cultivo simultaneo para tener duplicado.	57

- Figura 21. Apariencia de las esporidias en medio A) Grimm-Allen y B) YPD. Las líneas el fondo forman parte de las referencias de la Cámara Neubauer. Cuando la esporidia hija no se había separado, formó parte del conteo cuando su tamaño era por lo menos de la mitad de la esporidia madre. .58
- Figura 22. Ejemplo de curva estándar de absorbancia (540nm) vs glucosa (g·L⁻¹) para el medio Grimm-Allen (a) y YPD (b). Datos experimentales por duplicado.60
- Figura 23. A) Esporidias de *U. maydis* tomada de Fuchs et al. (2005), para comparar con el material aislado en este trabajo. B) Apariencia de la cepa silvestre aislada, en medio sólido PDA. C) Morfología de la esporidia silvestre aislada. D) Morfología de teliosporas antes de su germinación.....63
- Figura 24. A) Inoculación de matraces de 250 mL con 50 mL de medio. B) Momento de inoculación de matraces de 500 mL con 250 mL de medio, usados para seguir la cinética, medio YPD y Grimm-Allen, todo bajo condiciones asépticas y dentro de una campana de flujo laminar.....64
- Figura 25. Biomasa, concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo PDB. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.67
- Figura 26. Biomasa, azúcar residual y concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo YPD. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.....67
- Figura 27. Biomasa, azúcar residual y concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo Grimm-Allen. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.68

Figura 28. Cambio de pH en los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de esporidias de <i>U. maydis</i> . Media $\pm$ DS de tres repeticiones.....	69
Figura 29. Relación entre biomasa vs concentración de esporidias de <i>Ustilago maydis</i> . Media de tres repeticiones.	71
Figura 30. Cambios en la morfología de las esporidias de <i>U. maydis</i> en medio YPD en matraces agitados, a diferentes tiempos de cultivo. A 24 h de cultivo las esporidias tienen una forma característica, pero después de 72 h se alargamiento es evidente y se presentan ya las septas, es decir no se concluye la separación de las esporidias.....	73
Figura 31. Cambios en la morfología de las esporidias de <i>U. maydis</i> en medio Grimm-Allen en matraces agitados, a diferentes tiempos de cultivo. En este medio de cultivo la separación de esporidias se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo, sin embargo se apreciaron ciertos agrupamientos de esporidias, con un tamaño menor comparado con el inicio del cultivo.	74
Figura 32. Biomasa, concentración de esporidias de <i>U. maydis</i> en medio de cultivo PDB. Las condiciones de cultivo fueron 150 rpm, 7.2 pH, 2 vvm, 28 °C. Media $\pm$ DS de dos repeticiones, con muestreo por triplicado (6 valores).....	76
Figura 33. Biomasa, concentración de esporidias de <i>U. maydis</i> en medio de cultivo YPD. Las condiciones de cultivo fueron 150 rpm, 7.2 pH, 2 vvm, 28 °C. Media $\pm$ DS de dos repeticiones, con muestreo por triplicado (6 valores).....	76

Figura 34. Biomasa, concentración de esporidias de <i>U. maydis</i> en medio de cultivo Grimm-Allen. Las condiciones de cultivo fueron 150 rpm, 7.2 pH, 2 vvm, 28 °C. Media $\pm$ DS de dos repeticiones, con muestreo por triplicado (6 valores).	77
Figura 35. A) Gráfica semilogarítmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logarítmica para estimar $\mu_{\max}$. C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logarítmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar Y_s/x . Datos experimentales de tres repeticiones.	79

OBTENCIÓN DE INÓCULO DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* DC Corda) EN MEDIO LÍQUIDO.

INOCULUM OBTENTION OF HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* DC Corda) BY SUBMERGED CULTURE

Alejandro Martínez Flores.

Bajo la dirección del Dr. Teodoro Espinosa Solares.

RESUMEN

Ustilago maydis es el hongo causante del carbón común en maíz. Un síntoma de esta enfermedad es la formación de tumores o agallas, si éstas se forman en el elote de la planta se conocen como "huitlacoche"; el cual se consume como alimento en México. Su producción comercial implica inocular el elote del maíz con una solución de esporidias de *U. maydis*, llamada inóculo de huitlacoche. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de esporidias de *U. maydis* en tres medios de cultivo líquido, PDB, YPD y Grimm-Allen en matraces agitados y en biorreactor. Se estimó la biomasa por peso seco, la concentración por conteo directo y la glucosa residual por el método DNS. En matraces agitados, los valores de biomasa y concentración de esporidias fueron 5.74, 7.67, 4.91 g·L⁻¹ y 131 x 10⁶, 65 x 10⁶, 150 x 10⁶ mL⁻¹, en PDB, YPD y Grimm-Allen, respectivamente. En biorreactor, los valores de biomasa y concentración fueron 6.06, 7.9, 4.86 g·L⁻¹ y 89.1x10⁶, 74.6x10⁶, 104x10⁶ mL⁻¹, en PDB, YPD y Grimm-Allen, respectivamente. La glucosa fue consumida a las 140 y 100 h en matraz y biorreactor, respectivamente. La velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) fue similar entre los medios, sin embargo en biorreactor su valor incrementó de forma discreta. Los valores en matraz y biorreactor fueron 0.0206, 0.0210, 0.0281 h⁻¹ y 0.0214, 0.0228, 0.0450 h⁻¹ para PDB, YPD y Grimm-Allen, respectivamente. Bajo las condiciones utilizadas, no hubo diferencia evidente entre matraces y biorreactor. La mayor concentración de esporidias fue en el medio Grimm-Allen, mientras que la mayor biomasa se alcanza en el medio YPD.

Palabras clave: cinética, biomasa, esporidia, inoculación, carbón común, inóculo.

ABSTRACT

Ustilago maydis is the fungus that causes the common smut of maize. A symptom of this disease is the formation of galls, if these growths in the young ear in the plant they are known as "huitlacoche"; which is consumed as a food in Mexico. Its commercial production requires inoculating the young ear with a solution of sporidias from *U. maydis* called inoculum of huitlacoche. The aim of this work was to evaluate the production of sporidias of *U. maydis* in different liquid culture medium, PDB, YPD and Grimm-Allen, in shaking flasks and bioreactor. The biomass was estimated by dry weight, whereas the concentration was estimated by direct account and the residual glucose by DNS method. In shaking flask, the values of biomass and concentration of sporidias were 5.74, 7.67, 4.91 g·L⁻¹ and 131 x 10⁶, 65 x 10⁶, 150 x 10⁶ mL⁻¹, in PDB, YPD and Grimm-Allen, respectively. In bioreactor, the values of biomass and concentration were 6.06, 7.9, 4.86 g·L⁻¹ and 89.1x10⁶, 74.6x10⁶, 104x10⁶ mL⁻¹, in PDB, YPD y Grimm-Allen, respectively. The glucose was totally consumed at 140 and 100 h in shaking flasks and bioreactor, respectively. The maximum specific growth rate (μ_{max}) was similar between the culture mediums; however its value increased slightly in bioreactor. In shaking flask and bioreactor, the values were 0.0206, 0.0210, 0.0281 h⁻¹ and 0.0214, 0.0228, 0.0450 h⁻¹ in PDB, YPD and Grimm-Allen, respectively. Under the used conditions, there was not evident difference between shaking flask and bioreactor. The greatest concentration of sporidias was in the Grimm-Allen, while the greatest biomass was obtained in YPD medium.

Key words: kinetic, biomass, sporidia, inoculation, common smut, inoculum.

1. INTRODUCCIÓN

El hongo que infecta al maíz (*Zea mays*) y que origina la enfermedad llamada carbón común, tiene por nombre científico *Ustilago maydis* D.C. Corda y provoca importantes pérdidas en la producción de maíz alrededor del mundo (Christensen, 1963). Se trata de un hongo dimórfico, en una de sus formas es haploide, unicelular, se divide por gemación y no es patógeno, en otra forma es filamentoso, dicariótico, patógeno y requiere de la planta para completar su ciclo biológico (Banuett, 1992). Los síntomas de la enfermedad incluyen clorosis (tejido amarillento), síntesis de antocianina y la formación de tumores o agallas (Banuett, 1995), pues las células del maíz son estimuladas para que sufran hipertrofia e hiperplasia, originando los tumores (Banuett y Herskowitz, 1996). Los tumores se pueden desarrollar sobre todas las partes meristemáticas de la planta, incluyendo tallos, hojas, espiga y la mazorca (Bölker, 2001; Agrios 1998). Los agallas son una mezcla de tejido modificado de la planta (córtez, floema, xilema, parénquima y esclerénquima) y micelio del hongo (Villanueva, 2002).

Las agallas que se forman en el elote (mazorca joven) del maíz a causa del *Ustilago maydis*, se conocen en México como "Huitlacoche", nombre dado por los Aztecas (Pataky y Chandler, 2003). El término huitlacoche hace referencia a

1. INTRODUCCIÓN

El hongo que infecta al maíz (*Zea mays*) y que origina la enfermedad llamada carbón común, tiene por nombre científico *Ustilago maydis* D.C. Corda y provoca importantes pérdidas en la producción de maíz alrededor del mundo (Christensen, 1963). Se trata de un hongo dimórfico, en una de sus formas es haploide, unicelular, se divide por gemación y no es patógeno, en otra forma es filamentoso, dicariótico, patógeno y requiere de la planta para completar su ciclo biológico (Banuett, 1992). Los síntomas de la enfermedad incluyen clorosis (tejido amarillento), síntesis de antocianina y la formación de tumores o agallas (Banuett, 1995), pues las células del maíz son estimuladas para que sufran hipertrofia e hiperplasia, originando los tumores (Banuett y Herskowitz, 1996). Los tumores se pueden desarrollar sobre todas las partes meristemáticas de la planta, incluyendo tallos, hojas, espiga y la mazorca (Bölker, 2001; Agrios 1998). Los agallas son una mezcla de tejido modificado de la planta (córtex, floema, xilema, parénquima y esclerénquima) y micelio del hongo (Villanueva, 2002).

Las agallas que se forman en el elote (mazorca joven) del maíz a causa del *Ustilago maydis*, se conocen en México como “Huitlacoche”, nombre dado por los Aztecas (Pataky y Chandler, 2003). El término huitlacoche hace referencia a

la mezcla del crecimiento micelial del hongo y al tejido vegetal modificado de la mazorca y no específicamente al hongo. El nombre común de este producto puede variar, pero son "huitlacoche" y "cuitlacoche" los dos términos ampliamente usados en todo el territorio mexicano.

En los estados del centro de México, el huitlacoche es altamente apreciado, se considera una delicia y ha sido preparado en platillos típicos desde tiempos prehispánicos (Ruiz y Martínez, 1998). La información indica que el consumo humano del hongo comenzó precisamente en esta región del país (Villanueva, 1997).

Actualmente el gusto por este hongo no se limita a nuestro territorio, ha ido acentuando su popularidad como parte de la dieta y con ello está aumentando su aceptación en países de la Comunidad Europea, Japón y Estados Unidos (Villanueva, 1997). Paredes (2001) menciona que en las últimas décadas se ha consumido en algunas regiones de Estados Unidos y no solamente donde existe influencia de mexicanos, también en restaurantes de lujo de ese país y algunos localizados en las principales capitales de Europa. En Estados Unidos, el huitlacoche es vendido fresco o enlatado y se comercializa como "maize mushrooms" o "Mexican truffles" (Pataky, 1991).

Para que el consumo no dependa exclusivamente de la recolección de huitlacoche originado por infecciones naturales y debido al incremento en su popularidad y su alto precio, su producción controlada ya se ha considerado. Por lo anterior, se desarrollan investigaciones orientadas a la inducción de la enfermedad sobre las mazorcas jóvenes del maíz, para producir huitlacoche.

Los métodos de inoculación desarrollados para evaluar la susceptibilidad de líneas de maíz al carbón común también pueden ser usados para producir huitlacoche comercialmente (Valverde *et al.*, 1993). Un sistema de producción de huitlacoche (Villanueva, 1997) se debe basar en utilizar variedades susceptibles y un aislamiento de *U. maydis* seleccionado por su virulencia, así también, es necesario evaluar los beneficios o riesgos que esto implique.

Usando como base las investigaciones sobre los métodos de inoculación para inducir el carbón común en maíz (Pope y McCarter, 1992; Snetselaar y Mims, 1993), se han desarrollado trabajos para evaluar la producción y calidad de huitlacoche (Pataky, 1991; Valverde *et al.*, 1993), la composición química del huitlacoche producido en diferentes genotipos de maíz (Venegas *et al.*, 1995), el efecto de la concentración de inóculo utilizado así como el momento adecuado de inoculación (dU Toit y Pataky, 1999a; dU Toit y Pataky, 1999b), entre otras investigaciones realizadas.

En nuestro país la producción comercial de huitlacoche tiene importantes avances al respecto. Varias investigaciones se han desarrollado para la producción del hongo (Villanueva, 1997; Villanueva *et al.*, 1999, Martínez *et al.*, 2000), todas ellas con resultados referentes a técnicas de inoculación, concentración de inóculo, y variedades de maíces susceptibles, etc.

De forma general, la producción de huitlacoche implica coleccionar agallas para aislar teliosporas de *U. maydis* y entonces inducir la infección inoculando el elote de maíz (susceptible), con una solución de esporidias denominada "inóculo de huitlacoche". Las teliosporas se germinan y se reproducen las

esporidias en algún medio de cultivo en el laboratorio, se recuperan y se prepara el inóculo a la concentración deseada, generalmente 1×10^6 esporidias por mililitro.

En estudios realizados en la Universidad Autónoma Chapingo para la producción controlada del hongo, se ha producido inóculo en medio PDA (papa-dextrosa-agar). En medio de cultivo sólido las esporidias crecen adecuadamente pero resulta operativamente complicado recuperarlas, además un medio de cultivo líquido como el PDB (caldo de papa dextrosa) mostró mejores resultados al inducir la formación de huitlacoche, que cuando las esporidias son crecidas en medio PDA (Villanueva *et al.*, 1999). Por otro lado, en las investigaciones para inducir la formación de huitlacoche, se utiliza comúnmente el medio de cultivo PDB (Pataky y Chadler, 2003), aunque la fase no patógena del hongo crece sobre una gran variedad de medios de cultivo.

A pesar de que existen una variedad de trabajos sobre inducción de carbón común en maíz o para la producción de huitlacoche, solo algunos trabajos reportan información sobre la cinética de crecimiento de las esporidias de *Ustilago maydis*. Aparentemente no se han investigado las mejores condiciones de producción de esporidias de *U. maydis* en medio líquido y debido a que la producción de inóculo de huitlacoche es una parte fundamental en la producción comercial de este hongo comestible y considerando que se requiere una gran cantidad de inóculo, se ha planteado la presente investigación que pretende aportar datos sobre el cultivo de esporidias en medio líquido, teniendo como objetivo:

General: Evaluar la producción de esporidias a nivel de matraces agitados y en biorreactor en tres medios de cultivo.

Particulares:

A) Evaluar el efecto del medio sobre el crecimiento de *U. maydis* en dos sistemas de cultivo.

B) Caracterizar la cinética de crecimiento de *U. maydis* en los diferentes medios y sistemas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 EL PATÓGENO *Ustilago maydis*.

Los *Ustilagos* constituyen un grupo importante de patógenos y tienen el potencial de causar severas enfermedades en monocotiledóneas, a pesar de los tratamientos a semillas, plantas y a la existencia de variedades parcialmente resistentes y los diferentes métodos de cultivo empleados. Entre los *Ustilagos* patógenos, se pueden mencionar al *Ustilago hordei*, *Ustilago nuda* y *Ustilago nigra* que atacan a la avena; *Tilletia indica*, *Tilletia caries* y *Tilletia controversa* atacan al trigo, de este género el miembro más conocido es *Ustilago maydis* (Ruiz y Martinez, 1998).

El "carbón común" es una enfermedad que se presenta en el maíz (*Zea mays*), causada por el hongo *Ustilago maydis* (DC) Corda (Agrios, 1998). El carbón común del maíz es también conocido como "Huitlacoche", nombre Nahuatl por el cual es bien conocido en México desde tiempos ancestrales (Banett, 1995).

De acuerdo con Basse y Steinberng (2004) su taxonomía es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: *Basidiomycota*

Orden: *Ustilaginales*

Familia: *Ustilaginaceae*

1998), debido a que infecta cualquier parte aérea de la planta (Basse y Steinberg, 2004).

2.1.1 Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan parte de su ciclo de vida en las plantas y otra parte en el suelo o en los residuos vegetales (Agrios, 1998). *U. maydis* requiere de la planta de maíz para llevar a cabo su ciclo de vida, pues infecta exclusivamente al maíz (*Zea mays*) y a su progenitor, el teozintle (*Zea mays* Subs. *Parviglumis*), por lo cual tiene un rango de hospedantes muy reducido (Bolker, 2001; Basse y Steinberg, 2004; Christensen 1963). Se trata de un hongo dimórfico. El dimorfismo es una característica de algunos hongos, esto significa tener la capacidad para pasar de una forma unicelular tipo levadura a una forma filamentosa en respuesta a condiciones de su ambiente. El crecimiento tipo levadura implica divisiones mitóticas por gemación o fisión para producir células independientes. En la forma filamentosa, se producen hifas con largos tubos continuos, separados por una septa, formándose núcleos en cada una (Sanchez-Martínez y Pérez-Martín, 2001).

El ciclo de vida de *U. maydis* (Figura 2) de acuerdo a Casselton y Olesnický (1998) representa el ciclo de todos los basidiomycetos, se trata de un hongo dimórfico por lo cual se tienen dos etapas:

- **Forma saprofita:** En su forma asexual, existe como esporidias elongadas unicelulares las cuales son uninucleadas y se dividen por gemación. Las esporidias generan un filamento alargado, llamado tubo de conjugación

y se fusionan en sus extremos si tienen diferentes alelos en el locus *a*, si las esporidias tienen diferentes alelos *b*, el filamento dicariótico se forma después de la fusión.

- **Forma patógena:** Es la fase dicariótica y patógena, crece solo en la planta. La proliferación de la hifa al interior de la planta induce la formación de tumores, al interior de los cuales cada célula dicariótica se diferencia para formar una teliospora diploide y unicelular. La meiosis ocurre al interior de las teliosporas, y cuatro células haploides (incluyendo la teliospora original) son formadas como un promicelio, el cual se divide para formar esporidias y comienza de nuevo la etapa saprófita.

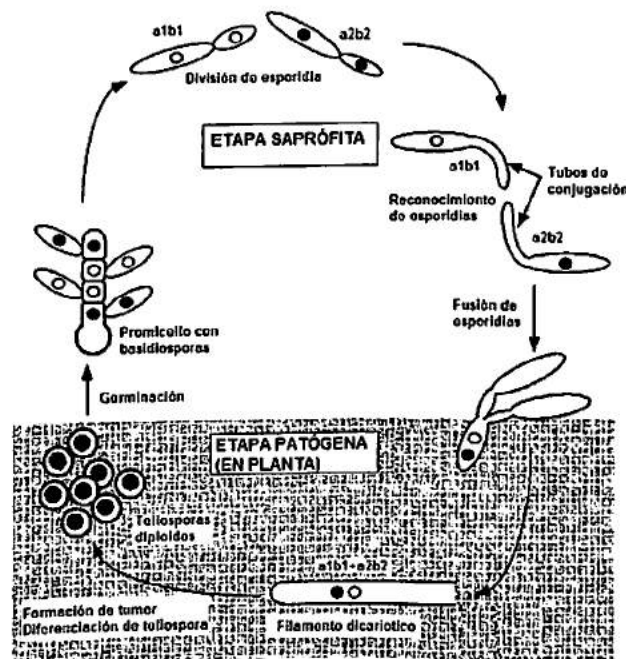


Figura 2. Ciclo de vida de *U. maydis*, mostrando las dos etapas de su ciclo.
Fuente: Modificado de Casselton y Olesnicky (1998).

Durante el ciclo de vida (Christensen, 1963) este hongo presenta tres fases nucleares: la diplofase, haplofase, y dicariofase. Éstas involucran la realización de cariogamia, meiosis y plasmogamia. La diplofase ($2n$) corresponde a las teliosporas maduras y finaliza cuando éstas germinan. La haplofase (n) inicia cuando se forma el promicelio y germinan las esporidias. La dicariofase ($n+n$) inicia con la formación del micelio y persiste hasta la formación de las teliosporas.

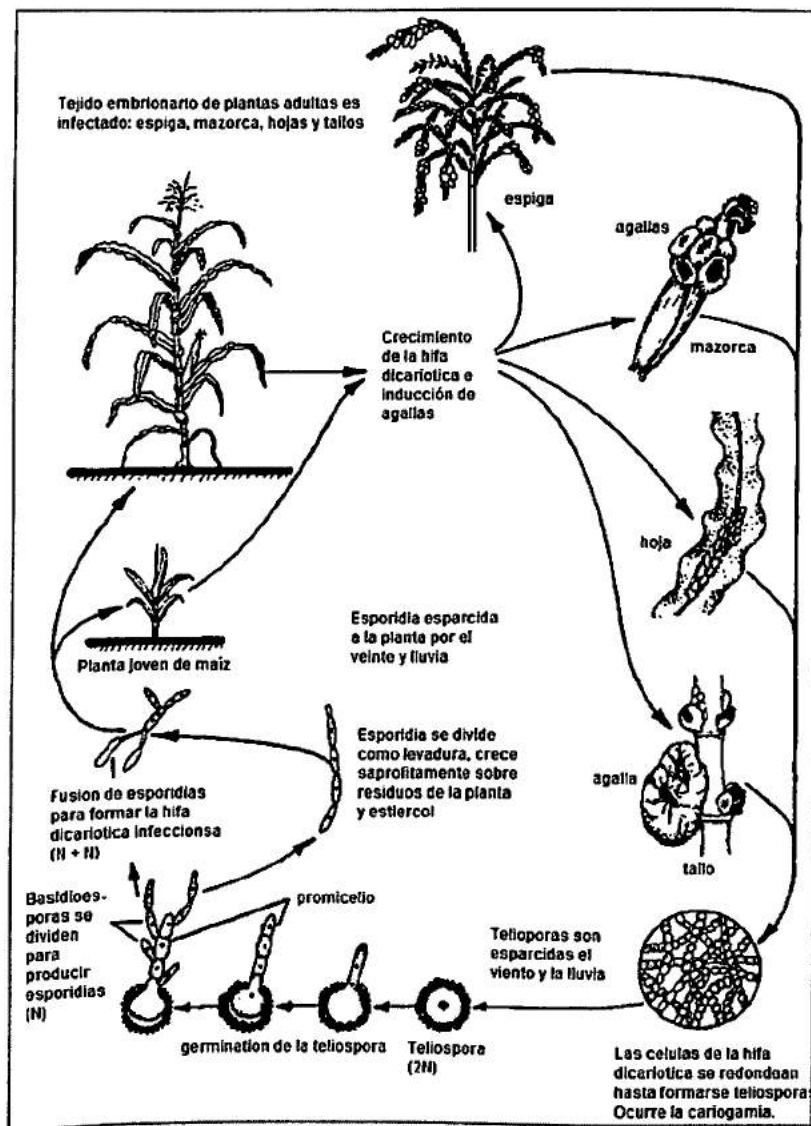


Figura 3. Ciclo de vida de *U. maydis* ilustrando las partes de la planta. Fuente: Modificado de Banuett (1992).

Para describir superficialmente el ciclo, se puede decir que el desarrollo patogénico de *U. maydis* comienza con la germinación de la teliospora diploide ($2n$). Mediante meiosis se producen esporidias haploides. Células haploides compatibles se fusionan para formar un filamento dicariótico, éste penetra a la planta, crece al interior y entre las células de la planta formando un tumor o agalla compuesto del tejido de la planta y el micelio del hongo. Al interior del tumor se lleva a cabo una fusión nuclear, el filamento se fragmenta y se desarrollan las células llamadas teliosporas (Banuett y Herskowitz, 1996).

2.1.1.1 Particularidades de las esporidias.

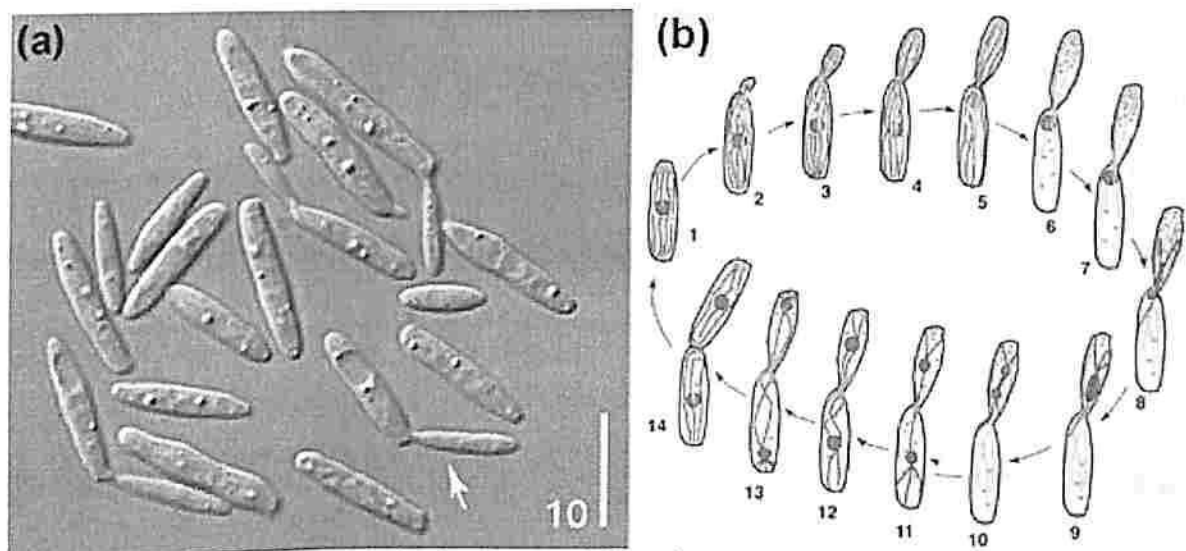


Figura 4. a) Morfología de las esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo líquido. Fuente: Steinberg y Perez-Martín (2007). b) Esquema de la división de la esporidia de *U. maydis*, en azul la posición del núcleo. Fuente: Banuett y Herskowitz, 2002.

Las células haploides del hongo *U. maydis* son alargadas con una longitud de entre 15 y 21 μm y 5 μm de ancho, se dividen por gemación (budding) formando un brote sobre uno de los extremos y se divide sólo una vez durante su ciclo de

vida. La generación de una nueva esporidia involucra una serie de cambios morfológicos asociados con el incremento en tamaño del brote (célula hija), de una forma cilíndrica o cónica a una forma elongada. Durante estos cambios, se ha observado que el núcleo migra del centro de la célula madre a la célula hija cuando ésta ha alcanzado el 50 % del tamaño de la madre (Figura 4); entonces el núcleo se divide. Una vez dividido regresa a la célula madre (Bannuett y Herskowitz, 2002). Esta forma haploide produce colonias compactas sobre una variedad de medios de cultivo y puede ser manejada por técnicas microbiológicas estándar (Banuett, 1992).

2.1.1.2 Particularidades del micelio dicariótico.

La forma patogénica de *U. maydis* es un filamento dicariótico (hifa), la cual consiste en células cilíndricas alargadas septadas (Bannett y Herskowitz, 1996). Para que se genere el micelio dicariótico es necesario que se lleve a cabo, el acoplamiento de esporidias compatibles. La fusión está bajo el control de dos locus, el *a* que regula la fusión celular y el *b* que regula el crecimiento filamentosos y la patogenicidad. La fusión celular ocurre sólo si las células tienen diferentes alelos en el locus *a*. Si las células también tienen diferentes alelos en el locus *b* el dicarion puede exhibir un crecimiento filamentosos (hifal); si los alelos en el locus *b* son iguales, el dicarion no tiene crecimiento filamentosos y tampoco crece tipo levadura; éste muere y es el fin en el ciclo de vida. (Bannet, 1995). Hay dos alelos para el locus *a* (*a*₁ y *a*₂) pero quizás hasta 25 alelos para el *b* (Puhalla, 1968). La fusión celular implica varios pasos: a) emergencia y

crecimiento de tubos de conjugación, b) fusión de los tubos para formar el dicarion, c) migración nuclear al punto de fusión y d) finalmente crecimiento filamentoso. El filamento dicariótico prolifera en el tejido de la planta (Figura 5), utilizando los contenidos de la célula para desarrollarse (Banuett, 1995; Banuett y Herskowitz, 1996). La mayoría de las células dicarióticas posteriormente se transforman en teliosporas las cuales son liberadas cuando se rompe la agalla (Agrios, 1998). El filamento dicariótico, en contraste a la forma haploide, es difícil de propagar en laboratorio en medios de cultivo, su crecimiento y diferenciación requiere crecer sobre la planta (Banuett, 1992).

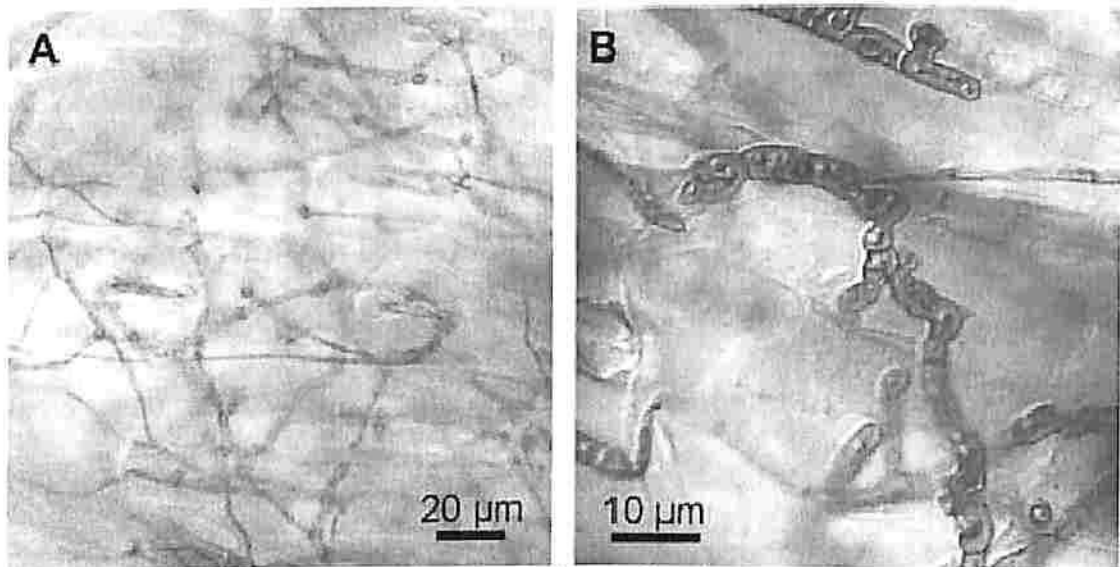


Figura 5. Crecimiento en planta. A) proliferación de la hifa. B) Fragmentación de la hifa, 9 días después de la inoculación en hoja de maíz con la mezcla de FB1 y FB2. Fuente: Basse y Steinberg, 2004.

2.1.1.3 Particularidades de las teliosporas.

Estas estructuras son el resultado de la diferenciación del micelio dicariótico, dando origen a células redondas donde ocurre la cariogamia, y se produce una

célula especializada, llamada teliospora. Esta es la forma diploide natural, tiene de 7-8 μm de diámetro y tiene una pared celular gruesa, normalmente es resistente a diversos tratamientos. La producción de las teliosporas ocurre únicamente en la planta. La teliospora no puede reproducirse vegetativamente (Banuett, 1995), por lo cual ni el crecimiento dicariótico ni formación de teliosporas ha sido observado en medios de cultivo, sugiriendo que la planta de maíz provee componentes cruciales y/o señales moleculares requeridas para la inicialización del desarrollo de las teliosporas (Kahmann *et al.*, 1999).

Al madurar los tumores se rompen expulsando una masa negra de teliosporas que pueden ser esparcidas por el viento (Banuett, 1995), Agrios (1998) menciona que las teliosporas invernan en los restos del cultivo en el suelo y pueden ser llevadas directamente a las hojas verdes del maíz.

Las teliosporas germinan sobre la planta o sobre un medio nutritivo y producen un filamento corto en el cual los núcleos diploides migran y experimentan meiosis, resultando en un filamento septado formando cuatro células haploides (Banuett, 1992). Al germinar (Banuett, 1995) el promicelio alcanza una longitud de 20-25 μm y un grosor de 2-3 μm . Los segregados meióticos (esporidias) pueden ser identificados, según su compatibilidad, a través de la reacción llamada reacción fuzz, la cual implica hacer cruces de éstas y determinar su crecimiento filamentoso lo que indicaría su compatibilidad, sobre el medio "charcoal" (Banuett y Herskowitz, 1989).

2.1.2 Síntomas de la enfermedad.

La enfermedad induce en la planta clorosis (Figura 6), producción de antocianinas y especialmente la formación de tumores (Banuett, 1995). Las células del maíz que rodean a la hifa son estimuladas para que sufran hipertrofia e hiperplasia y comienzan a formarse las agallas (Banuett y Herskowitz, 1996).

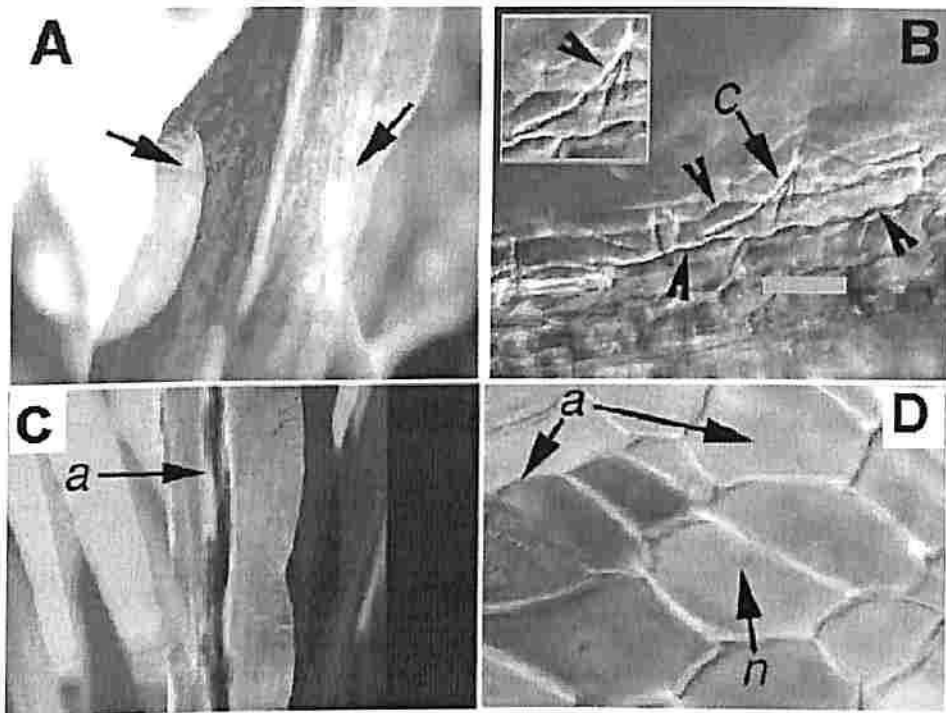


Figura 6. A) Clorosis en el tejido de la hoja (flecha), la imagen corresponde a un imagen 2.5 días después de la inoculación. B) Durante las primeras 24 h de inoculación, las esporidias se mantienen en la hoja en grupos, forman el tubo de conjugación e inmediatamente se fusionan. C) Muestra la presencia de antocianina sobre la nervadura de la hoja, 2.5 días después. D) Muestra una parte del tejido pigmentado, células rojo púrpura. a- antocianina, n-núcleo de la célula. Fuente: Banuett y Herskowitz, 1996.

Estos síntomas son aparentemente una respuesta de la planta a las señales fungosas transmitidas en los focos de infección. Eventualmente las teliosporas

dentro del tejido de las agallas maduras dan una apariencia negra y polvosa (Gold *et al.*, 1997).

La clorosis aparece 24 h después (Banuett y Herskowitz, 1996) de la inoculación de la planta con una cepa compatible (a1b2 + a2b2), se observan como pequeños puntos amarillos sobre la hoja, cercano al lugar donde fueron inoculadas. Dos a tres días después la clorosis se extiende y es fácilmente apreciada. La inducción de la síntesis de antocianina puede ser observada 2-3 días después de la infección, aunque se observa con más claridad días más tarde, después de la formación de los tumores. Cano-Canchola *et al.* (2000) encontraron que alrededor del sitio de inoculación la clorosis aparece 3 o 4 días después y la síntesis de antocianina ocurre 7 a 8 días después de la infección.

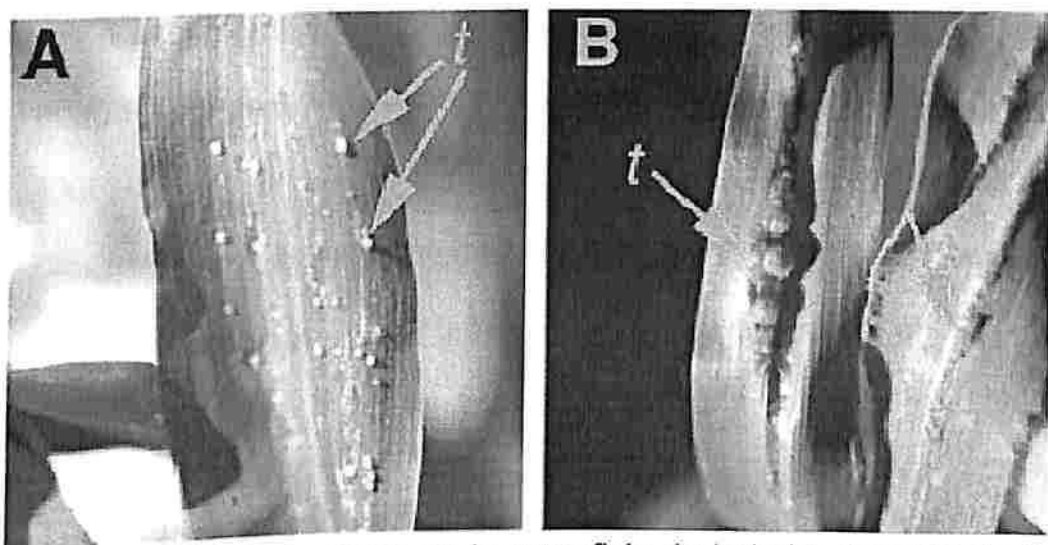


Figura 7. A) Pequeños tumores en la superficie de la hoja, después de 6 días, mostrando una distribución uniforme. B) Hojas con agrupamiento de tumores a lo largo de la nervadura de la hoja. Fuente: Banuett y Herskowitz, 1996.

Los tumores o agallas pueden desarrollarse sobre cualquier parte meristemática de la planta, incluyendo tallos, hojas, espiga y la mazorca (Bölker, 2001, Agrios

1998). Las agallas son una mezcla del tejido modificado de la planta (cortex, floema, xilema, parénquima y esclerénquima) y del micelio del hongo que crece al interior (Figura 7). El agrandamiento excesivo y anormal de las células de los tejidos de maíz infectados (hipertrofia e hiperplasia) por lo cual se forman las agallas, puede deberse a la producción de fitoreguladores de crecimiento: auxinas (ácido indol acético ó AIA) y citocininas, que estimulan las deformaciones del tejido y el desarrollo de las agallas (Villanueva, 2002). Se ha demostrado que aislamientos de *U. maydis* son capaces de sintetizar AIA a partir de L-triptofano en cultivo *in vitro*, en cantidades 1-1.8 µl/mL de medio, incluso en cantidades mayores de 3.5 µg/mL (Martínez *et al.*, 1997). También se ha encontrado que altos niveles de patogenicidad de *U. maydis* están asociados a altos niveles de producción de AIA, lo que soporta la hipótesis de que el hongo produce auxinas para generar tumores en la planta (Guevara-Lara *et al.*, 2000). Si las plantas de maíz infectadas son jóvenes, sobre sus hojas y tallo aparecen las agallas diminutas, de ahí que dichas plántulas puedan permanecer achaparradas o que incluso puedan ser destruidas por el patógeno (Agrios, 1998).

2.1.3 Control de la enfermedad e inhibición del crecimiento *In Vitro*.

El carbón del maíz es una enfermedad resistente a una variedad de productos químicos utilizados para el control de fitopatógenos, por tanto generalmente no se realiza control químico. Cuando se presentan infecciones naturales en campo, lo que se ha hecho desde hace décadas es eliminar las líneas maíz

más susceptible, para mantener la resistencia (Thakur *et al.*, 1989). Por lo cual, el uso variedades resistentes es el método más eficiente para controlar el carbón común.

La incidencia de carbón común entre maíces criollos e híbridos ha sido reportada desde principios de 1900. Se piensa que el maíz dentado es más resistente que el maíz dulce. La mayor resistencia del maíz dentado probablemente ha sido originada por el hecho de que las semillas de líneas infectadas son eliminadas de los programas de semillas. El maíz dulce puede ser menos resistente porque los mejoradores han sido menos severos con la eliminación de las líneas infectadas con agallas de carbón, debido a la poca variación genética del germoplasma de maíz dulce (Pataky, 2002).

Las investigaciones realizadas para demostrar el efecto de algunos productos sobre el hongo se han desarrollado en cultivos *in vitro*, ya sea en la etapa de la germinación de las teliosporas o bien sobre el crecimiento de las esporidias. En este sentido, se conoce que es resistente al Vinclozolin, un fungicida dicarboximida (DCFs por sus siglas en inglés) (Orth *et al.*, 1995). Sin embargo, el crecimiento de *U. maydis* en presencia de este fungicida se afecta, pues hay un incremento de septas en las esporidias, sugiriendo una inhibición en la gemación (budding); las células se dividen pero la separación es mínima. Pero, existen mutantes de aislamientos los cuales no muestran evidencia de inhibición. Para inhibir la división en el 50 % de las esporidias se necesita $1.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de vinclozolin en un aislamiento silvestre y para una cepa mutante, respectivamente.

Al tratar esporidias de *U. maydis* con Antimicina A, un antibiótico que inhibe el transporte de electrones a nivel de citocromo b y c, éste no inhibe la respiración de las esporidias y por lo tanto su división, y por el contrario la estimula, lo que puede indicar una activación de la ruta oxidasa alternativa (AOX), una ruta alterna de respiración que le permite al hongo crecer en presencia de este antibiótico (Sherald y Sisler, 1970).

Cuadro 1. Toxicidad de dos fungicidas al crecimiento de *U. maydis* determinado por el incremento en el número de esporidias. Fuente: Henry y Sisler, 1979.

Tratamiento	Conc. mg/mL	No. Esporidias ($\times 10^5$ mL ⁻¹)					
		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
Control	-----	6.9	12.3	18.5	28.2	39.8	101
Miconazol	0.025	6.9	11.0	16.0	17.0		43.2
	0.10	6.9	11.9	17.0	18.5	25.2	
	0.25	6.9	11.8	16.9	17.1	19.8	26.0
	1.0	6.9	11.0	16.1	17.6	19.6	
	2.5	6.9	6.1	6.2	10.0		27.0
	5.0	6.9	6.8	7.9	7.8		4.4
Dodecylimidazol	0.01	6.9	9.8	18.0	23.0		120
	0.10	6.9	11.1	13.2	23.3	32.2	83.2
	0.25	6.9	10.4	13.8	17.3	23.7	58.5
	1.0	6.9	8.0	11.0	11.4	15.6	28.8
	2.5	6.9	6.0	5.5	7.2		7.0
	5.0	6.9	7.6	8.6	7.9		4.3

El miconazol es extremadamente tóxico a *U. maydis*. Una concentración de 5.0 µg/mL previene completamente la multiplicación de las esporidias y por lo tanto disminuye el peso seco, sin embargo este efecto no fue detectado a concentraciones más bajas. El dodecylimidazol produce una inhibición mayor en las esporidias, concentraciones de 2.5 µg/mL inhiben completamente el incremento en el número de esporidias y peso seco (Cuadro 1) (Henry y Sisler, 1979).

El cloramfenicol es un antibiótico ampliamente usado para el control de bacterias. Algunos investigadores lo agregan al medio de cultivo donde se

reproducen las esporidias de *U. maydis* para evitar el crecimiento de bacterias, pues se sabe no afecta de forma considerable el crecimiento del hongo (Villanueva, 2007). Sin embargo, Ziogas y Georgopoulos (1980) encontraron que al adicionar 10 mM de cloramfenicol al medio de crecimiento del hongo (esporidias), aun cuando no inhibe su crecimiento, la fase logarítmica se incrementa al doble (menor velocidad) y la producción final de células fue reducida 30 %. Otro aspecto de este antibiótico es, que provoca que esporidias de *U. maydis* activen la ruta alternativa de respiración del hongo (OAX), confiriéndole resistencia a antibióticos que inhiben la respiración a nivel de citocromos.

2.1.4 Pérdidas en la producción de maíz ocasionadas por *U. maydis*.

La incidencia del huitlacoche no sólo reduce el rendimiento final de grano de maíz, también aumenta las dificultades para procesar la parte del maíz no contaminado. Las pérdidas producidas por este hongo es muy variable y presenta dificultades para ser medidas (Kealey y Kisikowski, 1981).

La importancia económica del carbón común es mayor en maíz dulce que en maíz dentado. Las agallas del carbón sobre la mazorca son particularmente perjudiciales para maíz dulce porque aun las agallas más pequeñas reducen la calidad de este. También, se tienen costos adicionales cuando el maíz dulce es cosechado y procesado de los campos con carbón (Pataky, 2002). Las pérdidas debidas al carbón del maíz varían ampliamente de una localidad a otra y pueden ir desde un valor insignificante hasta un 10% o más. Algunos campos

de maíz dulce pueden mostrar pérdidas que se aproximan a un 100%. Sin embargo, en general, en relación a las áreas extensas y al uso de variedades resistentes, las pérdidas en rendimiento de grano tienen un promedio de casi un 2% (Agrios, 1998).

2.1.5 Importancia de *U. maydis* para producción metabolitos.

Ustilago maydis es considerado un organismo experimental muy útil para el estudio de una gran variedad de procesos, incluyendo la recombinación y reparación de ADN, apareamiento (mating) y morfogénesis (Kronstad, 2003). Se ha convertido en importante modelo de los basidiomicetos patógenos de plantas (Kahmann y Kämper, 2004). Se ha utilizado para estudiar aspectos de la biología de los carbones, tales como el control genético del acoplamiento, dimorfismo y patogénesis, en parte debido a que puede ser analizado por genética clásica y molecular (Ruiz y Martínez, 1998).

Desde un punto de vista biotecnológico, *U. maydis* ofrece la posibilidad de utilizarlo como un productor de metabolitos y enzimas debido a su inocuidad para el humano (Ramos *et al.*, 2005). En algunas investigaciones al respecto se puede mencionar lo siguiente:

Producción de Sideroforos: Algunos microorganismos, cuando crecen en medios de cultivo deficientes en Fe^+ producen compuestos de bajo peso molecular llamados sideroforos, los cuales tienen afinidad específica por iones Fe^{3+} . Los sideroforos son responsables del transporte de los iones en periodos de estrés, garantizando su eficiente asimilación. Ferrocromo, fue el primer

siderofofo definido. Estudios han probado que aislamientos de *U. maydis* tanto materiales de laboratorio, como silvestres, producen ferrocromo y ferrocromo A (Wang *et al.*, 1989).

El ferrocromo y ferrocromo A aparentemente son los únicos sideróforos producidos por este hongo. El ferrocromo se almacena intracelularmente y se libera poco al medio, y se produce aun en concentraciones adecuadas de fierro; por otro lado el ferrocromo A se produce sólo bajo condiciones de estrés del ion fierro y es liberado al medio, generalmente no se acumula intracelularmente. Bajo ciertas condiciones el hongo puede producir de 23 a 450 mg/mL de ferrocromo A y 4.7 a 88 mg/mL de ferrocromo en el sobrenadante (Budde y Leong, 1989).

Extracción de enzimas: Se han caracterizado parcialmente enzimas extraídas del hongo, tales como Laccasa y Tirosinasa, las cuales pueden ser usadas en la reacción de polimerización de compuestos fenólicos y obtener polímeros de estos, con propiedades antioxidantes superiores a cuando se encuentran como monómeros (Desentis-Mendoza *et al.*, 2006).

También se ha demostrado (Spoedkner *et al.*, 1999) algunos aislamientos de *U. maydis* crecidos en medios de cultivo especiales, puede producir glicolipidos en altas cantidades, estas sustancias que tienen propiedades surfactante.

2.1.6 Bioquímica de *U. maydis*.

De acuerdo con Ramos *et al.* (2005) al igual que otros microorganismos, *U. maydis* utiliza la vía glucolítica para la degradación de la glucosa con el fin de

obtener energía en forma de ATP para el trabajo celular así como de intermediarios glucolíticos para la síntesis de precursores de aminoácidos y nucleótidos. Es probable que la glucólisis se vea afectada por las diferentes condiciones ambientales y nutricionales a las que está expuesto este fitopatógeno. La mitocondria de *Ustilago maydis* posee las dos rutas de producción de energía, la ruta de los citocromos (COX) y la ruta de la oxidasa alterna

(AOX). La actividad de la AOX en la mitocondria es baja. Sin embargo, esta actividad se estimula con α cetoácidos (piruvato) y con nucleótidos de purina (AMP), por lo que se supone que estos compuestos regulan a la AOX de las mitocondria de *U. maydis*, la AOX es regulada por piruvato y AMP (Sierra-Campos, *et al.*, 2005.).

2.2 USO ALIMENTICIO DEL HUITLACOCHÉ.

El nombre "Huitlacoche" fue dado por los Aztecas para nombrar a las agallas que se forman cuando la mazorca del maíz (*Zea mays* L.) está infectado, por el basidiomiceto *Ustilago maydis* (DC) Corda (Pataky y Chandler, 2003). El término huitlacoche hace referencia a la mezcla del crecimiento micelial del hongo y al tejido vegetal modificado de la mazorca y no específicamente al hongo. El nombre común de este producto puede variar, pero son "huitlacoche" y "cuitlacoche" los dos términos ampliamente usados en todo el territorio mexicano.

Las agallas producidas por el hongo, pueden crecer en cualquier parte aérea de la planta, incluyendo las cañas o tallos, hojas, espigas y mazorcas (Bölker, 2001). Sin embargo, sólo se nombra huitlacoche, se recolecta y consume, el formado en las mazorcas jóvenes (elote) del maíz (Figura 8).

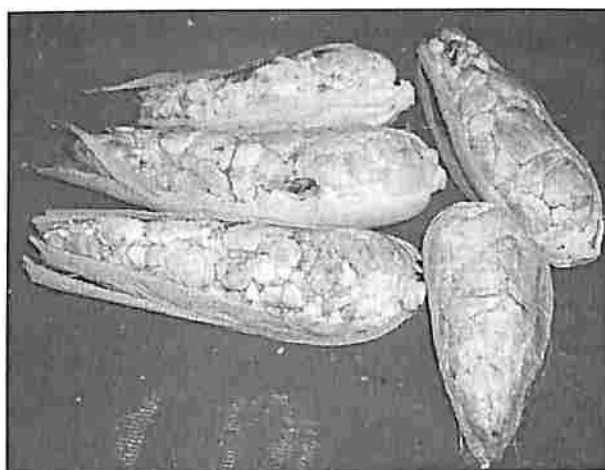


Figura 8. Agallas producidas por *U. maydis* llamadas huitlacoche usadas como alimento humano.

Hoy en día, el huitlacoche es una enfermedad tolerada y promovida por algunos productores tradicionales de maíz. El producto es recogido para autoconsumo y/o vendido en mercados regionales y procesado por algunas compañías procesadoras (Villanueva, 1997).

2.2.1 Consumo de huitlacoche.

En México el huitlacoche es considerado una delicia. Esto no sorprende debido a que el maíz fue domesticado en Mesoamérica. El hongo forma parte de platillos típicos desde el periodo precolombino en la parte central de México, y ha sido introducido recientemente dentro de la "alta cocina" de restaurantes de lujo con notable aceptación, no solo por nativos, también por turistas (Ruiz y

Martínez, 1998). De acuerdo a Villanueva (1997) la información indica que el consumo humano de huitlacoche comenzó en la región central de México. En estados como Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, México, Morelos, Oaxaca y Distrito Federal, el huitlacoche se consume en quesadillas, crepas y sopas, entre otros (Villanueva *et al.*, 2007).

Considerando que es un producto regional, no se conoce y no se registra el volumen consumido, sin embargo, Arnold (1992) estimó que en la Ciudad de México se comercializan entre 400-500 ton cada año durante la época de lluvias. Se sabe que la mayor producción y consumo en México se concentra en la época de lluvias (julio-septiembre), sin embargo, en las centrales de abasto de esta ciudad, se puede encontrar producto durante todo el año (Comunicación personal de vendedores de la Central de Abasto, D.F.).

En Estados Unidos, el huitlacoche es vendido fresco o enlatado, en áreas urbanas donde se comercializa como "maize mushrooms" o "Mexican truffles" (Pataky, 1991). El mercado potencial de huitlacoche fresco en los Estados Unidos está estimado en más de 45 Tn anuales (Farm Journal, 1990; citado por Pataky, 1991), además puede ser ordenado por internet a 30-40 dólares el Kg (Pataky y Candler, 2003).

2.2.2 Recolección del huitlacoche y comercialización.

El huitlacoche que se comercializa en los mercados y que se utiliza para la elaboración de comidas, proviene principalmente de la recolección del hongo que crece de manera espontánea en los campos de cultivo de maíz para

producción de grano y elotes en los Estados del centro de México (Villanueva *et al.*, 2007). Sin embargo, se sabe que en la Central de Abasto de la Ciudad de México se comercializa huitlacoche producido mediante infecciones inducidas por inoculación, a este producto los comerciantes lo denominan "híbrido". Este huitlacoche procede de estados como Puebla o Morelos, y la comercialización de éste se presenta en los meses cuando la oferta es menor. Sin embargo, no hay registros, sólo comunicaciones personales con comerciantes.

Poco se sabe del tiempo adecuado de cosecha del huitlacoche, pero se sabe que se deteriora fácilmente, a pesar de que las agallas continúan su desarrollo. La agalla pierde su integridad (frescura, calidad esponjosa), el tejido comienza a convertirse en teliosporas y con frecuencia las agallas no cubiertas se contaminan con otros microorganismos (Valverde *et al.*, 1993).

El huitlacoche se colecta cuando las agallas son blancas e intactas, se desprende la mazorca infectada de la planta de maíz, evitando quitar las brácteas que la cubren, pues estas brindan protección a las agallas durante su manipulación. Generalmente, las hojas son retiradas durante su venta. Se comercializa fresco y en mercados locales ya sea entero o desgranado, éste último presenta una coloración negra pues las agallas se rompen al desprenderlas y existe exposición de micelio y teliosporas. El precio del huitlacoche entero suele ser más alto que el que se vende desgranado (Figura 9).



Figura 9. Formas de comercialización de huitlacoche fresco, entero y desgranado.

2.2.3 Composición Proximal de Huitlacoche.

En el huitlacoche el contenido de proteína, carbohidratos y fibra es alto, contiene poca grasa, por lo que se le considera un alimento bajo en calorías (Cuadro 1). No obstante la cantidad de ácido linoléico es importante, pues es un ácido graso esencial para la nutrición humana. Por otro lado, supera los patrones que ha establecido la FAO para el consumo de aminoácidos en adultos (Paredes, 2000).

Se ha demostrado la gran variación en su composición proximal (Venegas *et al.*, 1995). Paredes (2000), encontró que el valor nutritivo varía en función del aislamiento (cepas), variedades de maíz y región de producción.

Al analizar el huitlacoche obtenido de la cruce de diferentes cepas, el rango de proteína varía desde 12.1% hasta 21.0% (Cuadro 3), lo que indica la gran influencia de las cepas en cuanto al contenido de proteínas de los diferentes huitlacoques producidos por ellas. El contenido de grasa también varía mucho,

se presenta en el rango que va desde 3 hasta 11% aproximadamente (Paredes, 2000).

Cuadro 2. Composición proximal de Huitlacoche en base seca (b.s.).

Componente	Peso seco (g/100 g)
Proteína	11.5 – 16.4
Grasa	1.6 – 2.3
Cenizas	5.2 – 7.0
Fibra	16.0 – 23.0
Carbohidratos	55.1 – 66.5

Fuente: Castro y Ruiz (2003)

Cuadro 3. Ejemplo de la composición proximal (% b.s.) de huitlacoche producido por la cruza de diferentes aislamientos.

Cruza	Proteína	Grasa	Cenizas	Fibra y CHO
T2 x I2	15.6	4.7	5.7	74.0
T3 x I1	17.1	7.3	4.3	71.3
T4 x P1	15.1	3.6	4.5	76.8
T5 x P2	17.5	7.6	4.0	70.9
I1 x I4	18.6	11.1	5.0	65.3
I1x P2	21.0	10.0	6.1	62.6
T6 x P2	12.1	8.6	4.8	74.5
FB1 x FB2	16.1	4.5	5.7	73.7

T2,T3,T4,T5,T6, (Aislamientos de Toluca, México). I1,I2,I4 (Aislamientos de Irapuato, Gto). P1, P2, (Aislamientos de Pachuca, Hgo.). Fuente: Paredes, 2000.

Venegas *et al*, (1995) comprobaron la variabilidad del valor nutritivo del huitlacoche producido sobre 19 híbridos, los resultados se muestran en el Cuadro 4. La cantidad de proteína del huitlacoche está entre 10.0% obtenido del híbrido Paksweet, y 14.5 % en el híbrido White Dynamite. Sobre híbridos de maíz palomero, se encontró mayor contenido de proteína, mientras que sobre maíz dentado el contenido es relativamente bajo. El contenido de grasa también

varía significativamente entre muestras de huitlacoche producidas sobre maíces dulces, dentados y palomero, los valores pueden ir desde 2.7 hasta 6.5 %.

Cuadro 4. Composición proximal de Huitlacoche producido sobre híbridos (% b. s.)

Hibrido	Proteína	Grasas	Cenizas	Fibra y CHO'S
Maíz Dulce				
HMX 9372	12.3	6.3	3.4	78.0
Serenity	11.5	4.5	4.5	79.5
FMX 292	12.9	6.3	3.8	77.0
Merlin	10.4	6.5	4.3	78.8
WH 3443	12.2	5.7	4.9	77.2
Midship	10.8	3.9	3.5	81.8
Starbrite	10.6	5.9	5.2	78.3
Paksweet	10.0	3.1	4.2	82.7
WHS 79071	11.9	6.4	4.1	77.6
BSS 4218	11.0	4.0	4.4	80.6
BSS 4544	13.7	2.7	3.7	79.9
ACX 92 CN 06	11.7	3.0	5.5	79.8
BSS 4498	13.4	3.4	4.3	78.9
Sch 30129	14.3	5.2	4.2	76.3
Maíz palomero				
Exp 0283	11.6	5.0	6.2	77.2
Cr 90135	14.1	2.7	4.8	78.4
Cr 84252	11.9	3.8	5.7	78.6
w. Dynamite	14.5	5.2	4.7	75.6
Maíz Dentado				
B73 X Mo17	10.5	3.7	5.2	80.6

Fuente: Venegas *et al.* 1995

La cantidad de proteínas es moderada pero es más alta que las presentes en el grano de maíz y otros cereales. Sus proteínas contienen un buen balance de aminoácidos esenciales, destacándose altas cantidades de histidina, treonina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y serina (Castro y Ruiz, 2003). Según Paredes (2001) tiene mayor contenido de proteínas; hasta 17% más que muchos otros hongos mejorados genéticamente; es uno de los alimentos con

mayor contenido de lisina que existe en la naturaleza y resulta que este es el aminoácido limitante por excelencia en el Maíz.

Cuadro 5. Contenido de ácidos grasos en huitlacoche producidos sobre algunos híbridos (mg/g, base seca).

Acido graso	No. C	FMX 292	Midship	WHX 79071	BSS 4218	Cr 84252
Laurico	12	Traza	Traza	Traza	Traza	Traza
Miristico	14	0.16	0.15	0.14	0.18	0.18
Palmitico	16	4.67	4.86	4.34	5.04	5.54
Estearico	18	0.90	0.78	0.98	1.01	1.50
Oleico	18:1	13.26	13.52	12.38	15.76	13.00
Linoléico	18:2	8.85	11.29	8.26	9.43	8.48
Linolenico	18:3	0.37	0.58	0.38	0.42	0.54
Araquidico	20	1.00	0.94	0.95	1.21	1.13
Behenico	22	0.54	0.56	0.53	0.63	0.68
Lignocerico	24	0.18	0.23	0.22	0.21	0.35

Fuente: Venegas *et al.*, 1995

Al realizar el análisis de ácidos grasos de huitlacoche producido sobre diferentes híbridos de maíz, ocho de maíz dulce y uno palomero, se observó que los principales componentes observados fueron ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, y los más importantes fueron oleico (18:1), linoléico (18:2) y el palmítico (16:0). El mayor porcentaje corresponde a ácidos grasos insaturados, y de éstos sobresale la cantidad de ácido oleico. El ácido oleico está en el rango de 41- 46.4 %, mientras que el ácido linoléico está en el rango de 27 – 34.2 % del total de ácidos grasos. El contenido varió dependiendo del híbrido sobre el cual fue producido el huitlacoche (Venegas *et al.*, 1995).

Lizarraga y López (1996) analizaron el contenido de aminoácidos libres en huitlacoche. Congelaron muestras a -80°C, la mitad la conservaron a esa temperatura y la otra mitad, la liofilizaron y conservaron a -4°C, para su

posterior análisis. Encontraron que los valores totales de aminoácidos libres son 21.62 y 20.91 mg/g para huitlacoche congelado y liofilizado respectivamente. Este análisis reveló que el huitlacoche contiene casi todos los aminoácidos esenciales y algunos no esenciales. Los aminoácidos esenciales abarcan 10.24 mg/g de los aminoácidos totales encontrados.

Lisina es el aminoácido más abundante en huitlacoche, con 3.21 mg/g lo que representa el 14.84 % del total de aminoácidos. Otros aminoácidos abundantes son glicina, leucina y ácido aspártico, los cuales juntos representan el 29.97% de los aminoácidos totales de huitlacoche (Lizarraga y López, 1996).

2.3 PRODUCCIÓN COMERCIAL DE HUITLACOCHES.

2.3.1 Avances en la producción de huitlacoche.

Diferente a otros hongos comestibles (colectados o cultivados) que son saprofitos, el hongo comestible huitlacoche sólo crece sobre las plantas vivas de maíz, por lo cual se requiere manipular el sistema huitlacoche-maíz para su producción comercial (Villanueva, 1997). Los métodos de inoculación desarrollados para evaluar la resistencia al carbón común del maíz pueden ser usados como base para producir huitlacoche comercialmente (Pataky y Chadler, 2003), la técnica debe inducir formación de agallas en los granos de forma constante (Pataky, 1991). Adicionalmente, para producir comercialmente huitlacoche, es necesario tener aislamientos de *U. maydis* altamente virulentos (Villanueva, 1997).

Las formas de producción u origen del huitlacoche pueden clasificarse en (Villanueva, 1997, Villanueva *et al.*, 2007) tres:

- 1) *Crecimiento espontáneo*: donde el huitlacoche es simplemente colectado de los campos de producción de maíz.
- 2) *Producción empírica*: los productores de maíz de los valles altos toleran la enfermedad e incluso buscan mayor incidencia de huitlacoche, recolectando el hongo y dispersando las teliosporas mezcladas con estiércol del ganado utilizado como fertilizante.
- 3) *Producción mejorada*: los productores son asistidos por profesionales para implementar el uso de técnicas de inoculación experimental para desarrollar la enfermedad.

Muchos de los estudios disponibles orientados a obtener producción artificial de huitlacoche se encuentran a nivel experimental, para obtener la mejor técnica de inoculación sobre híbridos comerciales de maíz dulce y variedades de polinización abierta (Martínez *et al.*, 2000). Los ensayos que tenían como objetivo infectar mazorcas de maíz y entonces poder cosechar los tumores, evaluándose parámetros como los establecidos por Villanueva *et al.* (2007):

- a) Incidencia = la proporción de plantas infectadas, respecto a las inoculadas
- b) Severidad = es la proporción promedio infectada de la mazorca respecto a total de la mazorca, tomada como unidad.
- c) Índice de severidad (X_w)= corresponde a la media ponderada del grado de cubrimiento de agallas en la mazorca, donde el factor de ponderación

es el número de mazorcas por categoría de severidad. El cálculo del índice de severidad, se realiza colocando el número de plantas (W_i), correspondiente a cada uno de las cinco categorías de severidad (X_i): 0, 25, 50, 75, 100 % (la escala puede variar), que es el porcentaje cubierto de la mazorca y se calcula como:

$$X_w = \frac{\sum W_i X_i}{\sum W_i}$$

Valverde *et al.*, (1993) evaluaron la susceptibilidad a *U. maydis* de 350 híbridos. Inocularon elotes de maíz cuando los pelos de la mazorca (estambres) tenían entre 3-6 cm, la incidencia de agallas en los híbridos varió de 0 % a 96 %. El 10 % de los híbridos presentó una incidencia de ≥ 60 %. 35 híbridos con ≥ 34 % de incidencia, 21 híbridos con menos de 34 %.

dU Toit y Pataky (1999a) estudiaron durante varios años, el efecto de cuatro concentraciones de inóculo (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 esporidias/mL). Cada mazorca fue inoculada por inyección de 3 ml de la solución abajo del sitio de emergencia de los estambres, cuando éstos habían emergido 1-2 cm. La incidencia de mazorcas con agallas estuvo en orden de 6-100 % con media de 63%, de 9-98 % con media de 58 % y de 23-100 % con media de 73 %, para 1995, 1996 y 1997, respectivamente. La incidencia incrementó con la concentración del inóculo, incrementó 40 % (usando de 10^3 a 10^6 esporidias/mL) y 15 %, en 1995 y 1997. La severidad de las agallas estuvo en el orden de 10-89 % con media de 41 %, de 2-45 % con media de 17 % y de 4-71 % con media de 24 % en

1995, 1996, 1997, respectivamente. La severidad incrementó con la concentración de inóculo para todos los híbridos.

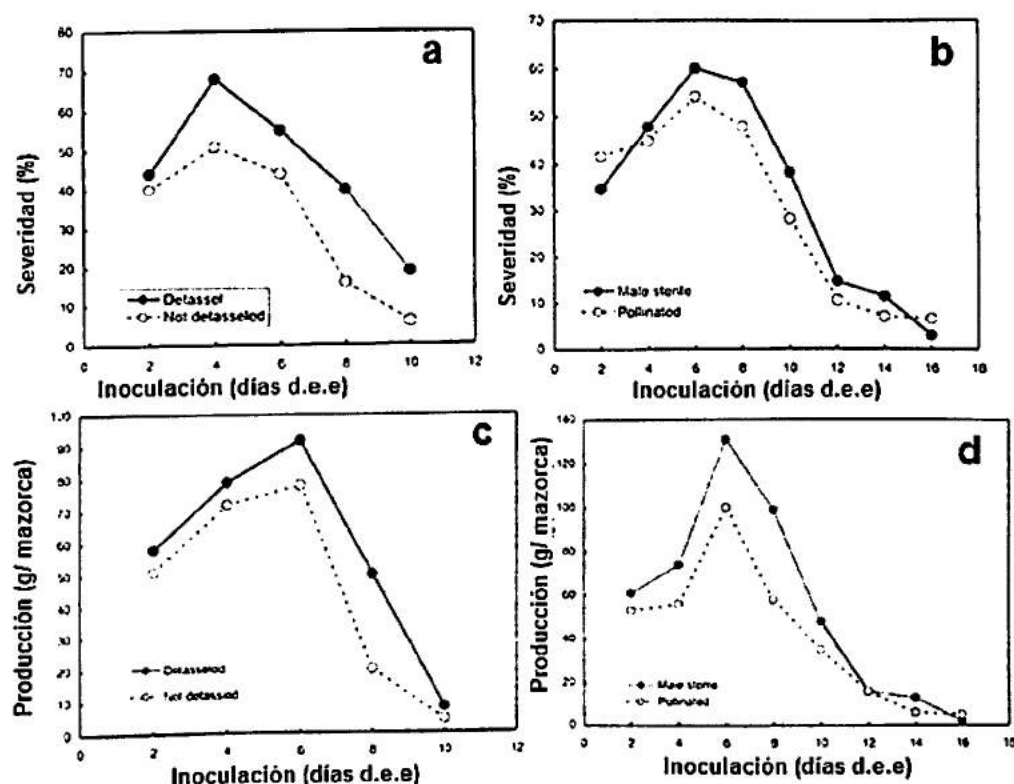


Figura 10. a y b) Porcentaje de severidad de las agallas de huitlacoche a diferentes días de inoculación, controlando la polinización quitando espiga o sin eliminarla o usando híbrido estéril, c y d) producción de huitlacoche (g/mazorca) controlando polinización por eliminación de espiga o usando híbrido estéril. Fuente: dU Toit y Pataky, 1999b.

También se ha estudiado la susceptibilidad de las mazorcas de maíz a la infección de *U. maydis* inoculando a través de los estambres a diferentes edades y el efecto de la polinización (dU Toit y Pataky, 1999b). Las mazorcas fueron inoculadas a intervalos de 2-3 días a partir de que emergieron los estambres, para estudiar el efecto de la polinización, se cubrieron las mazorcas

con bolsas antes de la emergencia de los estambres. La bolsa fue retirada después de la inoculación para permitir la polinización. Para la prueba de 1995, la incidencia en el rango de 0-100 % con media de 51 % para mazorcas cubiertas y 45 % para mazorcas no cubiertas. La incidencia difiere significativamente con la edad de los estambres y fue 85,66, 26 y 7 % cuando fueron inoculadas a 0, 4, 6 y 12 días después de la emergencia, respectivamente.

Otro trabajo para evaluar el efecto de la polinización y la edad de los estambres fue desarrollado por Pataky y Chadler (2003), encontraron que la severidad de la infección disminuye con los días de emergencia de los estambres, lo mismo sucede con la producción de huitlacoche, los mejores resultados se presentan cuando las mazorcas son inoculadas a los 4-6 días después de la emergencia. Además, evitar la polinización también origina mejores resultados, la polinización fue evitada, eliminando la espiga de la planta (detassel) o usar híbridos estériles (male sterile).

2.3.2 Rendimiento de huitlacoche.

Las investigaciones que se realizan con el fin de inducir las agallas de huitlacoche sobre la mazorca del maíz, han comenzado a mostrar resultados favorables. Por ejemplo, Pérez (1999) evaluó la reacción de familias de maíz a la infección con *U. maydis*, para producir huitlacoche. Sus mejores resultados los obtuvo cuando encontró rendimientos por planta de 123.65 g y 123.48 g de

huitlacoche, al traspolar estos resultados a rendimiento por hectárea el resultado es 6.18 y 6.17 ton/ha respectivamente (con 50 000 plantas/ha).

Martínez *et al.* (2000) evaluaron y seleccionaron 100 aislamientos de *U. maydis*, inoculados sobre plantas de maíz. Esto permitió seleccionar a 12 aislamientos los cuales fueron los más virulentos, mismos que mostraron un 9.54% de plantas con mazorca totalmente cubierta por agallas de huitlacoche, índice de severidad de 36.82 y rendimiento de hongo por planta inoculada e infectada de 135.24 y 190 g, respectivamente; dando lugar a un rendimiento estimado de hongo de 8.11 t/ha. Dentro de estos 12 aislamientos más virulentos, se encontró uno que fue significativamente superior en las variables índice de severidad (50.6), rendimiento del hongo por planta infectada (279.7 g) e inoculada (215.2 g) lo que representa un rendimiento extrapolado de 12.91 t/ha (60,000 plantas/ha).

Ruiz y Castro (2001), realizaron pruebas para determinar el efecto del sitio de inoculación de una cruza de dos cepas de *U. maydis* en dos híbridos regionales en el Valle del Yaqui, Sonora, México. Lograron producir huitlacoche con rendimientos de 1937 Kg/ha en el híbrido PNS-4019 Y 769 kg/ha en el híbrido H-431. Concluyeron que en general la técnica de inoculación en el jilote resultó significativamente muy superior en porcentaje de infección, índice de severidad y rendimiento de huitlacoche; comparada con la técnica de inoculación en tallo, y que el centro del jilote fue el mejor sitio en la producción de huitlacoche.

2.3.3 Producción de inóculo de huitlacoche.

La producción de huitlacoche consiste en inducir la infección inoculando el elote de maíz, con una solución de esporidias, denominada "inóculo". Las esporidias de *U. maydis* se producen crecen en algún medio de cultivo, se recuperan y se diluyen con agua estéril a la concentración deseada, generalmente 1×10^6 mill/mL.

La forma de producción de esporidias para la inducción del carbón común o bien la producción de huitlacoche puede variar según el grupo de investigadores, en el Cuadro 6 se encuentran algunos formas.

Cuadro 6. Formas de producción de esporidias de *U. maydis* usadas como inóculo para inducir el carbón común (hojas) o evaluar la producción de huitlacoche.

REFERENCIA	DESCRIPCION DE PRODUCCIÓN
Thakur <i>et al.</i> (1989)	Teliosporas fueron germinadas en PDA, 5 días a 23 °C. Las esporidias resultantes fueron crecidas sobre agar y colonias provenientes de una simple esporidia fueron aisladas. Para inocular se crecieron el aislamiento por 5-7 días, después recuperadas del agar y se concentró a 10^6 esporidias/mililitro. Igual volumen de esporidias compatibles fueron mezcladas para constituir el inóculo.
Valverde <i>et al.</i> (1993) Venegas <i>et al.</i> (1995)	Líneas de monoesporidias, fueron cultivadas en agar-papa-dextrosa (PDA) y caldo de papa-dextrosa (PDB) por 3 días aproximadamente. Los cultivos del medio sólido y líquido fueron mezclados para producir una suspensión de 5000 esporidias/mL.
Snetselaar y Mims, (1993)	Utilizaron cultivos de esporidias conservadas en Agar-papa-dextrosa (PDA). Inocularon matraces de 50mL, conteniendo 10 mL de caldo de papa-dextrosa (PDB). Los matraces se colocaron en un agitador e incubados a temperatura ambiente con agitación vigorosa continua por 12-24 h, después se transfirieron unas gotas a matraces con medio fresco, se incubo hasta alcanzar concentraciones de 10^5 - 10^6 (~18 h), se centrifugaron a 7000 rpm/6 min, y se resuspendieron en agua.
Snetselaar <i>et al.</i> 2001	Aislamientos compatibles de <i>U. maydis</i> FB1 (a1b1) y FB2 (a2b2) mantenidas sobre PDA. Fueron crecidas por separado en PDB en oscuridad a 28 °C a 200 rpm. Antes de inocular las plantas, las células fueron centrifugadas a 2000

	x g por 5 min. Las células fueron resuspendidas en agua estéril a una DO_{600nm} de 1 (aprox. 2×10^7 células/mL). Volúmenes iguales de cada aislamiento fue combinado y mezclado e inmediatamente usado en campo. Se inoculó en el sitio de emergencia de los estigmas usando 1-3 mL por mazorca.
dU Toit y Pataky (1999a) dU Toit y Pataky (1999b) Pataky y Chandler, (2003)	Aislamientos compatibles fueron crecidos por separado en matraces de 100 mL conteniendo 50 mL de medio PDB (caldo de papa dextrosa) sembrados con esporidias mantenidas en caja petri con PDA. Los matraces se incuban a temperatura ambiente por 18-24 h, a 120rpm. Para producir el inóculo, se usan matraces de 2 L con medio PDB estéril sembrados con alicotas de aproximadamente 0.5 mL de la suspensión de esporidias provenientes del matraz de 100 mL. Estos se incuban a temperatura ambiente en agitación por 12-18h.
Martínez <i>et al.</i> (2000) Villanueva <i>et al.</i> (2007)	Teliosporas se cultivaron en cajas petri con medio PDA (papa dextrosa agar + cloramfenicol), incubándose a 26 °C en obscuridad por 4 días para su germinación. Se aislaron las esporidias y se pueden crecer hasta 72 h, posteriormente se recuperan y puede preparar la suspensión de esporidias

Se puede pensar que al suspender las esporidias en agua, éstas pueden perder su viabilidad si no se inoculan rápidamente. Sin embargo, se ha demostrado que de forma general (Guevara-Lara *et al.*, 2000) las esporidias mantienen su viabilidad (conteo por UFC/mL) por tiempos prolongados en agua, incluso aparentemente incrementan su viabilidad, sin embargo este hecho puede deberse a que después de un tiempo las esporidias que han muerto sufren lisis, lo que puede proveer de nutrientes que permite la reproducción de otras células durante su suspensión en agua (Figura 11).

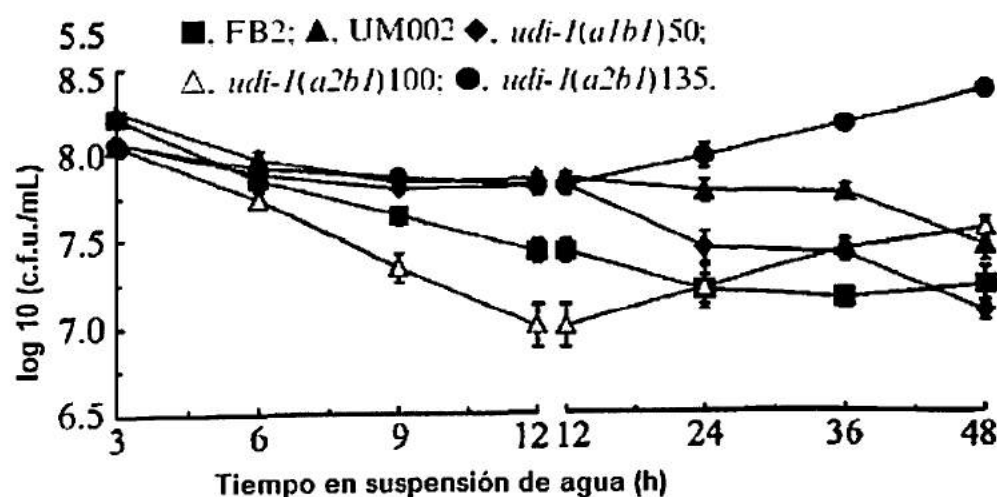


Figura 11. Viabilidad de esporidias de algunos aislamientos de *U. maydis* a 25 °C, suspendidas en agua, sembradas en PDA para conteo de UFC. Fuente: Guevara-Lara *et al.* (2000).

2.4 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

Cuando una cantidad pequeña de células vivas es adicionada a un solución líquida con nutrientes esenciales, a temperatura y pH adecuados, las células crecen. El proceso de crecimiento tiene dos manifestaciones de acuerdo a la morfología de las células involucradas. Para organismos unicelulares su crecimiento es debido a su división, el incremento en biomasa (masa de materia viva) es acompañado del incremento en el número de células presentes. Para el crecimiento de hongos, la longitud y el número de micelio incrementan. Asociado con el crecimiento hay otros dos procesos: consumo de algún material por la célula y producción de algún metabolito o producto (Bailey y Ollis, 1989).

2.4.1 Sistema de cultivo en lote o discontinuo.

El sistema discontinuo o en lote consiste en sembrar un medio líquido con un inóculo de células vivas, nada (excepto algún gas) es adicionado al cultivo o removido de él durante el proceso de crecimiento. La concentración de nutrientes, células y productos cambian con el tiempo (Bailey y Ollis, 1989). También deben considerarse las condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH, si se establecen al inicio es probable que varíen durante el transcurso, a no ser que se controlen externamente (Quintero, 1981). Una expresión general es:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, S, I, T, pH, \dots etc)$$

Después de la inoculación de la solución nutritiva estéril se pueden observar cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Crueger y Crueger, 1989). De acuerdo con Doran (1998), las diferentes fases de crecimiento se distinguen más fácilmente cuando se representa el logaritmo de la concentración de las células viables frente al tiempo (Figura 12). La velocidad de crecimiento depende de la fase de crecimiento. Durante la fase de adaptación o latencia inmediatamente después de la inoculación, la velocidad de crecimiento es prácticamente cero. Si el crecimiento es exponencial, la fase de crecimiento aparece como una línea recta en una representación semilogarítmica por lo que a veces se denomina fase logarítmica.

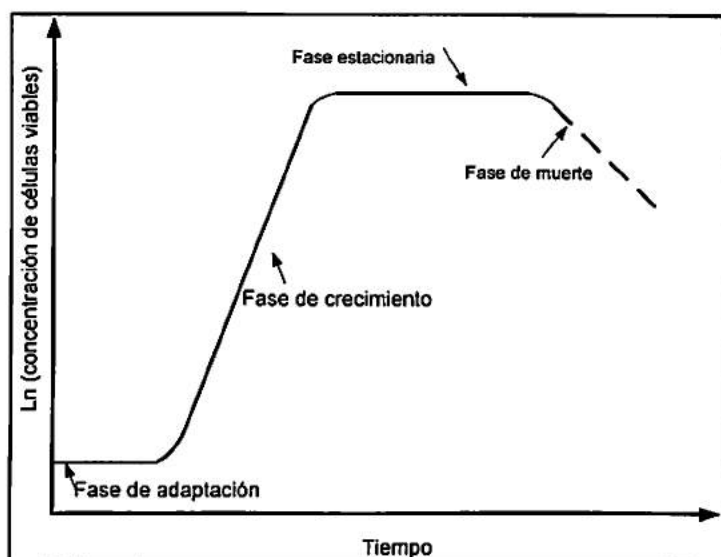


Figura 12. Curva típica de crecimiento celular. Fuente: Doran (1998).

Durante las fases de crecimiento logarítmico, la velocidad de crecimiento celular se describe mediante la ecuación:

$$r_x = \mu x \quad (1)$$

Donde r_x es la velocidad volumétrica de producción de biomasa con unidades de $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, x la concentración de células viables en unidades de $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, y μ la *velocidad específica de crecimiento* en h^{-1} . En un sistema cerrado donde el crecimiento es el único proceso que afecta a la concentración celular, $r_x = dx/dt$ e integrando la ecuación (1) se obtiene una expresión para x en función del tiempo. Si μ es constante puede integrarse directamente con la condición inicial $x=x_0$ a $t=0$ para obtener:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Donde x_0 es la concentración de células viables al tiempo cero. La ecuación (2) representa un crecimiento exponencial. Tomando logaritmos:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

De acuerdo a la ecuación (3), una representación de $\ln x$ frente al tiempo daría una línea recta de pendiente μ . Como la relación de la ecuación (3) únicamente es válida si μ no varía, para determinar si la velocidad específica de crecimiento es constante se utiliza normalmente una representación de $\ln x$ vs t , entonces μ es constante durante la fase logarítmica. Es aconsejable realizar una representación una representación semilogarítmica de concentración celular antes de identificar las fases de crecimiento. Pues si las concentraciones celulares se representan en coordenadas normales, el crecimiento parece lento al comienzo del cultivo. Esto puede inducirnos a pensar que existe una fase de adaptación. Sin embargo, cuando se representa utilizando logaritmos, se evidencia que algunas veces no se presenta la fase de adaptación. El crecimiento siempre parece mucho más lento al comienzo del cultivo debido a que el número de células presentes es pequeño.

El tiempo requerido para que el número de células o peso seco se duplique, llamado tiempo de duplicación t_d , es relacionado a la velocidad específica de crecimiento por

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

Ocasionalmente es encontrado que el tiempo de duplicación para el número de células y el peso seco pueden diferir.

2.4.2 Efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento celular.

De acuerdo con Doran (1998), la velocidad específica de crecimiento de las células durante las fases de crecimiento y muerte de un cultivo discontinuo, depende de la concentración de nutrientes existentes en el medio. A menudo, uno de los sustratos ejerce un mayor efecto sobre la velocidad de crecimiento. Este componente se denomina *sustrato limitante de la velocidad de crecimiento* o simplemente *sustrato limitante*. A menudo este sustrato es el carbono o el nitrógeno y en algunos casos el oxígeno. Por lo tanto, la velocidad específica de crecimiento está relacionada con la concentración de sustrato limitante del crecimiento mediante la *ecuación de Monod*, una expresión homóloga a la de *Michaelis-Menten*:

$$\mu = \frac{\mu_{max} s}{K_s + s} \quad (5)$$

En la ecuación (5), s es la concentración de sustrato limitante del crecimiento en $g \cdot L^{-1}$, μ_{max} la *velocidad específica máxima de crecimiento* en h^{-1} y K_s la *constante de sustrato* en g .

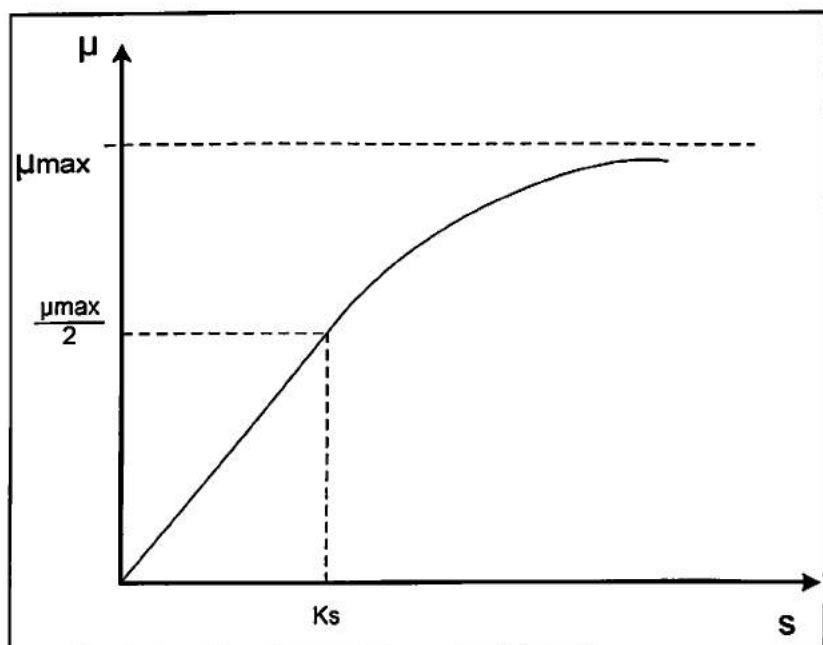


Figura 13. Relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato limitante del crecimiento en un cultivo celular. Fuente: Doran (1998).

2.4.3 Cinética de consumo de sustrato.

El sustrato consumido por las células se canaliza a diferentes rutas metabólicas. Parte del sustrato puede utilizarse directamente en el crecimiento y en la síntesis de producto, mientras que otra parte se utiliza para generar la energía necesaria para las actividades de mantenimiento. El sustrato requerido para el mantenimiento varía considerablemente dependiendo del organismo y de las condiciones de cultivo. Una estimación completa del consumo de sustrato debería incluir un componente de mantenimiento. La velocidad específica de consumo de sustrato para actividades de mantenimiento se conoce como el *coeficiente de mantenimiento*, m_s . La importancia fisiológica de

m_s ha sido muy debatida, ya que existen indicios de que m_s no es constante a todas las velocidades de crecimiento, para un determinado organismo.

La velocidad de consumo de sustrato puede expresarse en función de la concentración de biomasa mediante la ecuación:

$$r_s = q_s x \quad (5)$$

donde r_s es la velocidad volumétrica de consumo de sustrato con unidades de, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ o $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$, q_s la *velocidad específica de consumo de sustrato* con dimensión de h^{-1} , y x la concentración de biomasa.

En algunos cultivos no existe la formación de producto extracelular. En ausencia de formación de producto se supondrá que todo el sustrato que entra a la célula se utiliza para el crecimiento y funciones de mantenimiento. Las velocidades de estas actividades celulares están relacionadas de la siguiente manera:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{xs}} + m_s x \quad (6)$$

donde r_x es la velocidad volumétrica de producción de biomasa, Y_{xs} el rendimiento verdadero de biomasa a partir de sustrato, m_s el coeficiente de mantenimiento y x la concentración de biomasa. La ecuación (6) establece que la velocidad de consumo de sustrato depende en parte de la velocidad de crecimiento pero que varía con la concentración de células presentes. Cuando r_x se expresa en función de μ la ecuación generada es:

$$r_s = - \left[\frac{\mu}{Y_{xs}} + m_s \right] x \quad (7)$$

Si en la ecuación (7) μ se expresa en función de la concentración de sustrato mediante la ecuación (5), la ecuación se transforma en:

$$r_s = - \left[\frac{\mu_{max} S}{Y_{xs}(k_s + S)} + m_s \right] x \quad (8)$$

Cuando s es cero, la ecuación (8) predice que el sustrato se consumirá a una velocidad igual a $m_s x$. El consumo de sustrato en ausencia de sustrato es imposible, por lo cual que esta situación en la ecuación (8) no es realista. El problema surge debido a la suposición implícita que se ha realizado sobre la naturaleza de las actividades de mantenimiento. Sin embargo, la ecuación es una descripción realista del consumo de sustrato siempre que exista sustrato en el exterior.

2.4.4 Sistema de cultivo alimentado.

Una mejora del proceso cerrado o discontinuo es la fermentación alimentada. En los procesos alimentados los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de algunos metabolitos de interés está sometida a represión catabólica por altas concentraciones de algunos nutrientes. En el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al inicio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción. Como no es posible medir directamente el sustrato durante la fermentación, pueden usarse parámetros indirectos para determinar la velocidad de alimentación (Crueger y Crueger, 1989).

2.4.5 Sistema de cultivo continuo.

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al bioreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes con los microorganismos, se retira simultáneamente del sistema (Crueger y Crueger, 1989). Los sistemas estructurados para el cultivo continuo de microorganismos es llamado frecuentemente *quimiostato*, que controla la densidad de población celular como la velocidad de crecimiento del cultivo. Para lograr el control es importante la velocidad de dilución y la concentración de un nutriente que actúa como factor limitante, puede ser la fuente de carbón o nitrógeno.

La determinación de la concentración celular, (x), se hace de diversas maneras, dependiendo de las características físicas de los organismos, principalmente su tamaño. El crecimiento celular se determina midiendo el número de células o la masa celular. El número de células se puede medir en organismos unicelares (bacterias, levaduras).

2.4.6 Cinética de crecimiento de *Ustilago maydis*

Existen pocos trabajos relacionados con la cinética de crecimiento de esporidias de *U. maydis*, sin embargo, algunos datos relacionados con el tema, pueden ser tomados de investigaciones que involucran a este hongo.

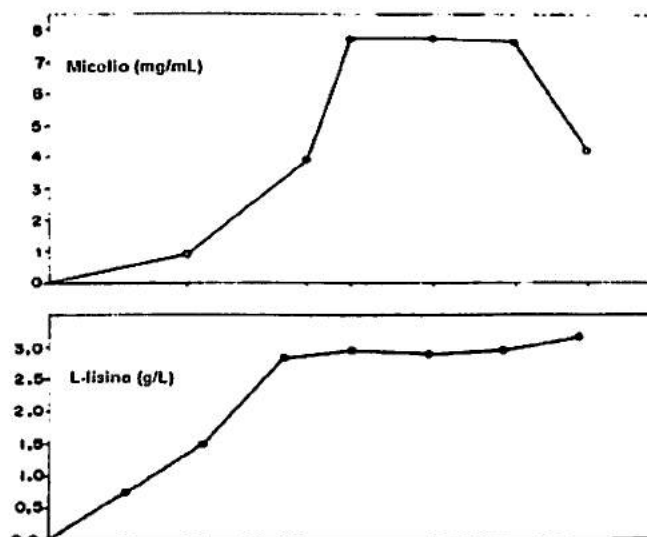


Figura 14. Cinética de crecimiento de *U. maydis* y producción de L-lisina. Fuente: Sánchez-Marroquí et al., (1970).

Sánchez- Marroquí *et al.*, (1970) utilizó *U. maydis* para la producción extracelular de Lisina, un aminoácido de importancia alimenticia. Empleando diferentes fuentes de carbono, las condiciones de fermentación fueron: 30 °C, 5.8 pH, 120 rpm, 0.3 vvm, empleando un biorreactor de 7.5 L. Alcanzando un máximo de biomasa de 7.7 mg/mL después de 96 h de fermentación y la producción de lisina por encima de los 2.5 g/L (Figura 14).

Budde y Leong (1989) determinaron la biomasa de esporidias crecidas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Fe^{3+} y aun cuando su objetivo fue determinar la producción de un metabolito, también determinaron la biomasa. Sus resultados permiten ver que el tiempo para alcanzar el máximo de biomasa (esporidias), el cultivo debe llevarse más allá de 160 h y el mejor de los casos alcanzo los 7 mg/mL (Figura 15A).

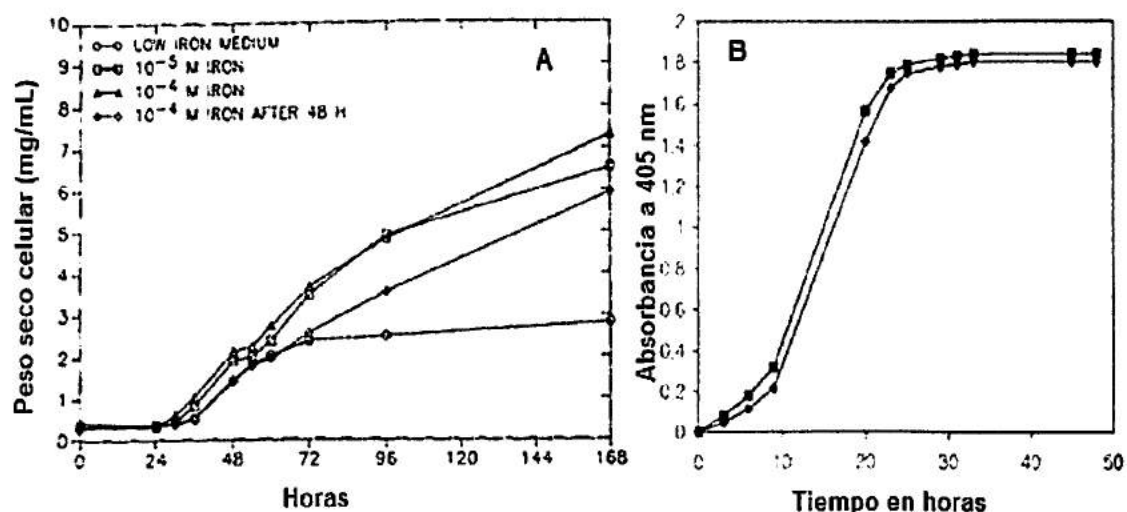


Figura 15. A) Promedio de peso seco de células de *U. maydis* cultivadas en medio con diferente concentración de Fe^{3+} . Fuente: Budde y Leong (1989). B) Cinética de crecimiento de esporidias de *U. maydis*, sobre caldo de papa-elote-sacarosa, con y sin Con A, Fuente: Saavedra *et al.* (2003).

Saavedra *et al.* (2003) evaluaron el efecto de agregar una proteína llamada Concavalina A (Con A), sobre el crecimiento de esporidias. Se conoce que la Con A parece activar la germinación de las teliosporas y el crecimiento de *U. maydis*. El crecimiento fue determinado mediante turbidez ($\text{DO}_{405\text{nm}}$), por lo cual los resultados son poco ilustrativos (Figura 15B). Sin embargo, se observó que al agregar esta proteína se obtiene un discreto efecto activador sobre el crecimiento, y un cambio en el tamaño de las esporidias. Sin Con A se registraron esporidias elipsoidales de 2 ± 0.3 de grosor y $10 \pm 0.3 \mu$ de largo, mientras que al usar la proteína los valores fueron $3.3 \pm 0.5 \mu$ y $15 \pm 1.5 \mu$, respectivamente. Las esporidias, que normalmente son delgadas y alargadas, se transformaron en estructuras más largas y con engrosamiento en algunas

zonas que ocasionan deformaciones. Igualmente se presentaron ramificaciones y mayor gemación, apreciándose también agregación celular.

Spoeckner *et al.* (1999) en su trabajo sobre la producción de glicolípidos por *U. maydis* reporta datos de crecimiento celular mediante proteína celular (g/L). Como resultado se alcanza un máximo de 1.5 g/L de proteína celular, después de un período de cultivo de seis días.

Cano-Canchola *et al.* (2000) al evaluar la producción de enzimas del hongo en medio de cultivo y en la planta de maíz, encontró que los aislamientos utilizados (FB2 y FB-D12) crecen sobre todas las fuentes de carbón evaluadas, siendo la glucosa y el tejido meristemático de maíz los nutrientes más eficientes, pues sobre estos sustratos, el tiempo de duplicación fue de 1.9 a 2.2 h para ambos aislamientos. Sobre xilosa y xilana los tiempos de duplicación fueron de 3 a 5 h. Un valor de 2.5 h fue observado sobre la fuente de carbón CM-celulosa.

Kim *et al.* (2001) al estudiar la actividad de la enzima Amonio-liasea fenilalanina (PAL por siglas en inglés) determinaron el crecimiento de esporidias de *U. maydis* en diferentes fuentes de carbón. La figura 16 indica que en glucosa las esporidias alcanzan una concentración de más de 150 millones de esporidias. Aunque no se indica las condiciones del cultivo. Al evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno, encontraron que la peptona es la mejor fuente para el crecimiento del hongo, superando a fuentes como el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_6$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

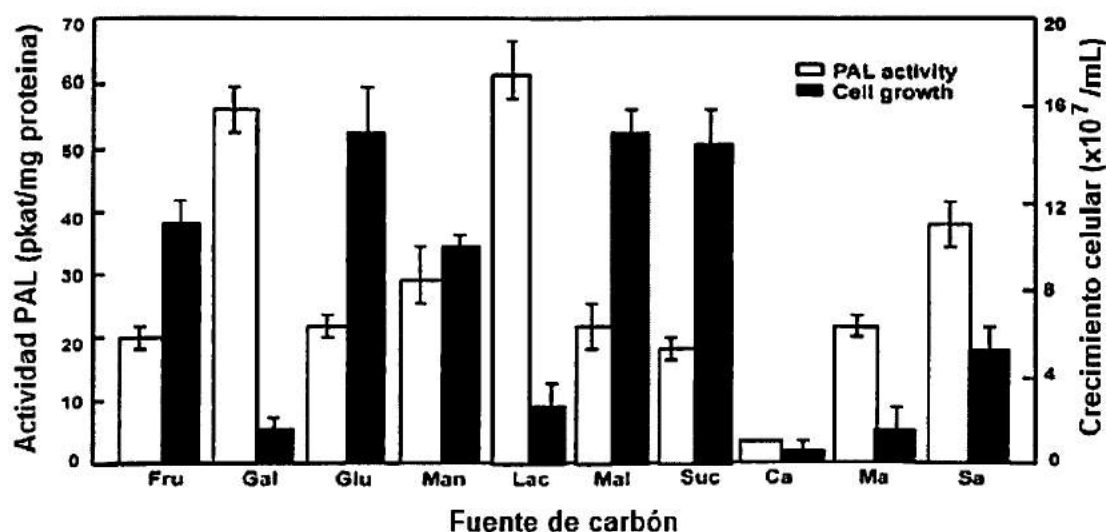


Figura 16. Efecto de varias fuentes de carbon sobre el crecimiento celular de *U. maydis* y la actividad PAL. Fructosa, Galactosa, Glucosa, Manosa, Lactosa, Maltosa, Sucrosa, Ácido cítrico, Ácido málico, Ácido succínico. Las células fueron crecidas por 36 h en medio mínimo compuesto de 20 mM NH_4NO_3 , y solución basal de sales con cada fuente de carbón al 2%. Fuente: Kim *et al.* (2001).

El trabajo donde sí se revisó la cinética de *U. maydis* es el de Drews y Kraume (2002). Evaluaron la cinética de crecimiento y producción de sideroforos de *U. maydis* en medio Grimm-Allen, en lote y cultivo (Figura 17) utilizando un biorreactor. De acuerdo con estos autores la máxima biomasa se presenta después de las 48 h. En el experimento batch, una temperatura de 27 °C y pH de 7.2 fueron determinados como las condiciones óptimas de operación. Siguiendo una ecuación del tipo Monod, los parámetros básicos de crecimiento fueron encontrados como $\mu_{\text{max}} = 0.19 \text{ h}^{-1}$. La producción de sideroforos alcanzó la concentración por arriba de 250 mgL^{-1} . Después de 2.5 días el sustrato fue totalmente consumido.

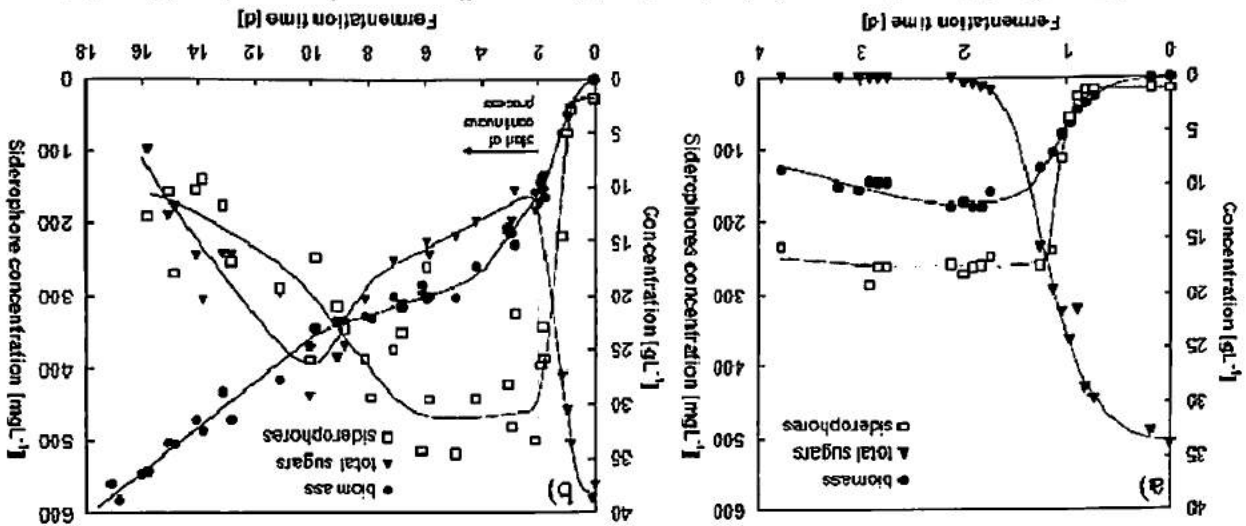


Figura 17 Cinética de crecimiento de *U. maydis* para la producción del metabolito denominado sideroforo. Fuente: Drews y Kraume (2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Aislamiento de *Ustilago maydis*.

Teliosporas de *Ustilago maydis* fueron aisladas de mazorcas de maíz completamente infectadas por el hongo (Figura 18), proveniente de una infección natural. El aislamiento se realizó con la metodología descrita por Villanueva *et al.* (2007). Agallas grandes y completas fueron lavadas con agua esterilizada, desinfectaron en su superficie con alcohol al 90 %, seguida de una desinfección con cloro comercial al 6 % (hipoclorito de sodio), empleando algodón para evitar daños. Una vez desinfectadas, se hizo un corte en el peridio (estructura blanca de la agalla) con ayuda de una aguja de disección estéril, de tal forma que se exponga el micelio y las teliosporas del hongo.



Figura 18. Aspecto de las mazorcas de maíz infectada naturalmente con *U. maydis*, antes y después de ser colectadas.

Con un asa bacteriológica estéril se extrajo la cantidad necesaria de teliosporas y fueron rayadas (estría simple) sobre medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) adicionando 500 mg/L de cloramfenicol, para evitar el crecimiento de bacterias. Se incubaron a 28 °C por 72 h; tiempo durante el cual se garantiza que la mayoría de las teliosporas han germinado dando origen a las esporidias, que son la fase no patógena del hongo y que puede multiplicarse empleando algún medio de cultivo. Las esporidias se sembraron en el medio de cultivo nuevo (PDA + Cloramfenicol) y fueron incubadas a la misma temperatura. Después de tres días de incubación, se conservaron transfirieron a refrigeración.

3.2 Medios de cultivo utilizados.

Los medios de cultivo evaluados fueron PDB (Caldo Papa-Dextrosa) marca BD Bioxon®, YPD (2% Glucosa, 1 % extracto de levadura (BD Bioxon®) , 0.5 % peptona de caseína (BD Bioxon®) y medio Grimm- Allen de acuerdo a Drews y Kraume (2006), la composición de éste último medio se muestra en el Cuadro 7. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. La esterilización de los medio de cultivo fue a 121 °C, 15 min.

Cuadro 7. Composición del medio Grimm-Allen. Todos los productos de la marca J.T. Baker®

Componente	Concentración (g·L ⁻¹)	Componente	Concentración (g·L ⁻¹)
Glucosa-H ₂ O	20	FeSO ₄ 7H ₂ O	1.5 x 10 ⁻⁴
NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	3	MnCl ₂ 5H ₂ O	3.05 x 10 ⁻⁵
K ₂ HPO ₄	3	CuSO ₄ 5H ₂ O	6.25 x 10 ⁻⁶
C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O	1		
NaSO ₄	0.88		
MgSO ₄ 7H ₂ O	8x10 ⁻²		
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2.67x 10 ⁻³		

3.3 Esporulación en matraces agitados.

Esporidias de *Ustilago maydis* fueron sembradas en medio PDA (agar-papa-dextrosa + 500 ppm de cloramfenicol) e incubadas durante 4 días a 28 °C. Después de lo anterior, las esporidias fueron sembradas con un asa bacteriológica en matraces de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio de cultivo, incubados a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ a 100 rpm, por 24 h, posteriormente se transfirieron 12.5 mL (5 %) a matraces Erlenmeyer (con baffles) de 500 mL conteniendo 250 mL del medio de cultivo. Éstos fueron incubados a 28 °C y 100 rpm, durante 150 h (Figura 19). El pH inicial del medio fue ajustado a 7.2 con NaOH 1M. Los experimentos fueron conducidos por triplicado, en los tres medios de cultivo utilizados.

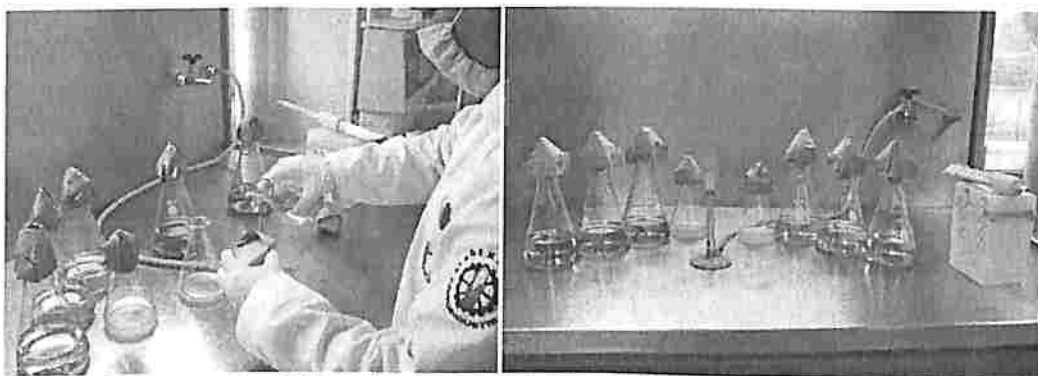


Figura 19. Matraces de 500 mL con medio de cultivo estéril antes de inoculación, y matraces de 250 mL con esporidias crecidas 24 h usadas para inocular, manejado en condiciones asépticas.

3.4 Esporulación en biorreactor.

Esporidias de *Ustilago maydis* fueron crecidas en PDA + 500 ppm de cloramfenicol, durante 4 días a 28 °C, y con un asa bacteriológica se transfirieron a un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL, después de 24 h, 7.5

mL (5 %) se transfirieron a matraces de 500 mL conteniendo 150 mL del medio, después de 24 h aproximadamente, esta suspensión de esporidias se utilizó para inocular el biorreactor; en ambos casos se utilizó $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 100 rpm y el pH se ajustó inicialmente a 7.2.

Se utilizó un bioreactor BIOFLO 110 Fermentor/Bioreactor (*New Brunswick Scientific* Edison, N.J. U.S.A) con vaso de 2 L, el volumen de trabajo fue 1.75 L. El biorreactor está equipado con un agitador de dos turbinas Rushton, cuenta con un electrodo pH METTLER TOLEDO (405-DPAS-SC-R85), electrodo de O_2 disuelto METTLER TOLEDO InPro 6800 y sensor de temperatura. Los parámetros de fermentación fueron controlados por el sistema de control. Para suministrar aire se utilizó dos bombas de aire conectadas en serie, una BOYU® modelo S-4000B y una OPTIMA®. Las condiciones de la fermentación fueron: velocidad de agitación 150 rpm; velocidad de aireación 2 vvm, temperatura de 28°C , el pH fue controlado automáticamente a 7.2 con NaOH 0.5M y H_2SO_4 0.1M, se usó Tween 80 al 5% (v/v) como agente antiespumante. Para cada medio de cultivo se realizó por duplicado la cinética, con muestreo por triplicado en la unidad experimental (biorreactor).

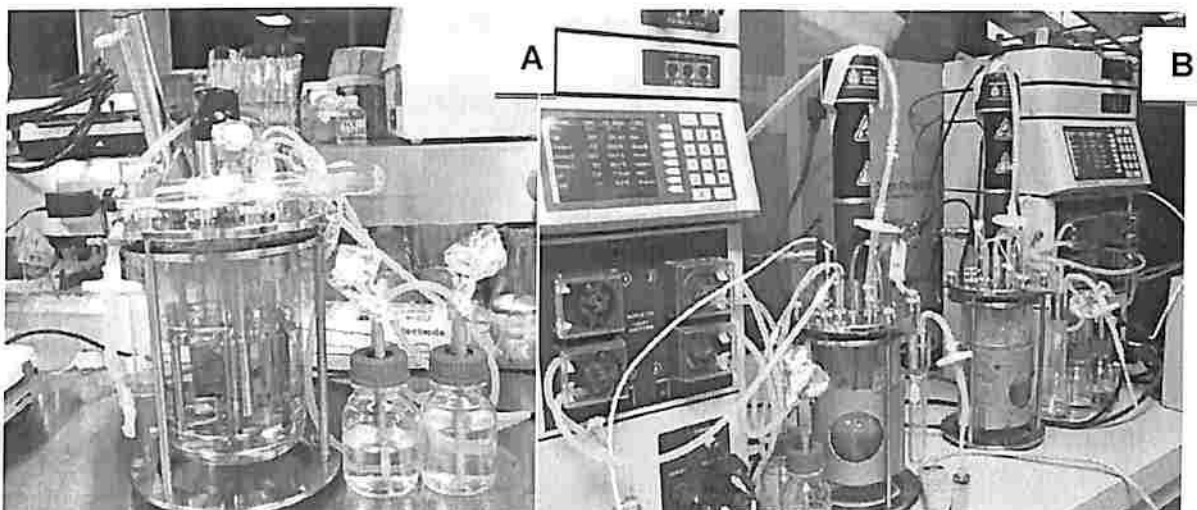


Figura 20. A) Preparación del vaso del biorreactor con medio YPD antes de su esterilización en autoclave. B) Biorreactores en con cultivo simultaneo para tener duplicado.

3.5 Métodos analíticos.

3.5.1 Conteo directo de esporidias de *U. maydis*.

La concentración de esporidias se determinó por conteo directo (esporidias/mL), empleando una cámara Neubauer (Marienfeld, Germany) y microscopio (Olimpus, CX31RB5FA, Japon). La cámara Neubauer es similar a un portaobjetos, cuenta con una serie de canales o marcas longitudinales y transversales que al cruzarse forman un área de 1mm^2 . El portaobjetos tiene una profundidad de 0.1mm , de tal forma que al colocar el cubre objetos, el volumen de los cuadros donde se realiza el conteo es 0.1mm^3 . Entonces, la técnica consiste en contabilizar el número de esporas 0.1mm^3 . Los resultados se reportaron en:

$$\text{Número de esporidias} \cdot \text{mL}^{-1} = (\text{Esporidias en } 0.1\text{mm}^3) \cdot (10\,000)$$

Adicionalmente durante el conteo directo se tomaron algunas fotografías con una cámara digital, para ilustrar los cambios morfológicos en los medios de cultivo.

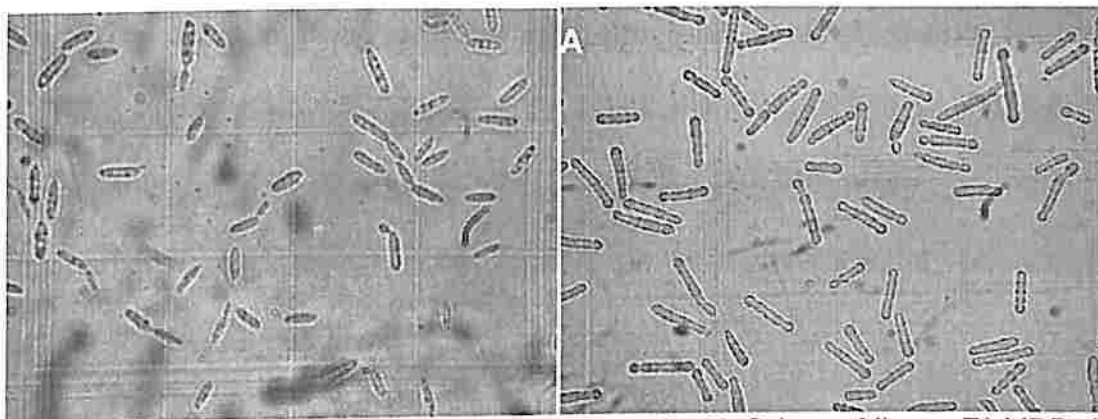


Figura 21. Apariencia de las esporidias en medio **A)** Grimm-Allen y **B)** YPD. Las líneas del fondo forman parte de las referencias de la Cámara Neubauer. Cuando la esporidia hija no se había separado, formó parte del conteo cuando su tamaño era por lo menos de la mitad de la esporidia madre.

3.5.2 Estimación de biomasa por peso seco.

El crecimiento fue monitoreado como peso seco. Una muestra de volumen conocido fue centrifugada a 8500 rpm (Sorvall Heraeus, *Biofuge primo*) durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en una charola de aluminio (previamente pesada) con agua salina (3 mL de cloruro de sodio al 0.09%) y colocada a 80°C por 24h, después de esto las charolas se retiraron de la estufa, se enfriaron en un desecador y se pesaron en una balanza (Startorius, CP324 S), para obtener el peso final.

3.5.3 Estimación de glucosa residual.

Se usó el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), éste consiste en determinar el cambio de absorbancia a 540 nm del reactivo DNS una vez que reacciona con los azúcares reductores contenidos en el medio de cultivo (sobrenadante). La absorbancia fue transformada a concentración de glucosa, con la curva estándar de glucosa (g/L) vs absorbancia a 540 nm.

El procedimiento para la determinación de la concentración de azúcares reductores fue el siguiente:

- En un tubo de ensaye de 10 mL, se mezcló 0.5 mL del reactivo DNS y 0.5 mL de muestra del sobrenadante de la centrifugación (caldo de cultivo, considerando la nota en el apartado de elaboración de curva estándar).
- Se homogenizó en un vortex y se calentó en un baño de agua en ebullición (100 °C), durante 5 minutos exactamente. Justo después se colocó en baño de agua fría durante 10 minutos.
- Posteriormente, a la solución se le añadió 5 mL de agua destilada, se homogenizó y entonces se le determinó la absorbancia a 540 nm contra un blanco (en vez de medio se utilizan 0.5 mL de agua destilada, tratado de la misma forma).

Curvas estándar de glucosa

Para la construcción de la curva estándar de glucosa es necesario preparar 20mL del medio de cultivo a utilizar, conteniendo una concentración de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

de glucosa (otros componentes en cantidad normal). Se realizaron diluciones como lo indica el cuadro 8 y por duplicado se trata la muestra según la técnica de determinación de la concentración de azúcares reductores con el reactivo DNS.

Cuadro 8. Diluciones para la construcción de la curva patrón de glucosa.

MUESTRA	g ^L ⁻¹ DE GLUCOSA EN LA MUESTRA	mL DE SOL. DE GLUCOSA DE 2 g ^L ⁻¹	mL H ₂ O DESTILADA	ABSORBANCIA
1(blanco)	0.0	0.0	1.0	
2	0.2	0.1	0.9	
3	0.4	0.2	0.8	
4	0.6	0.3	0.7	
5	0.8	0.4	0.6	
6	1.0	0.5	0.5	
7	1.2	0.6	0.4	
8	1.4	0.7	0.3	
9	1.6	0.8	0.2	
10	1.8	0.9	0.1	
11	2.0	1.0	0.0	

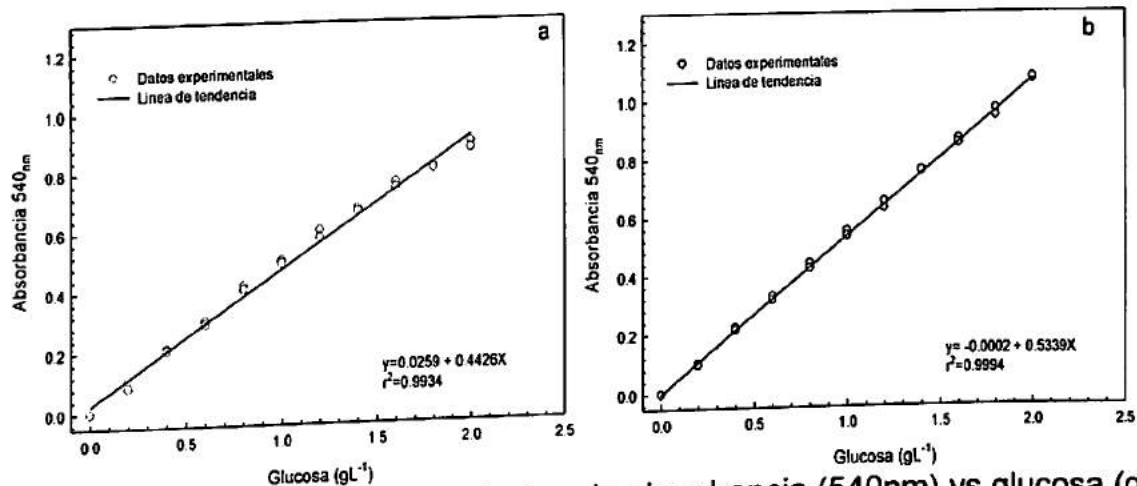


Figura 22. Ejemplo de curva estándar de absorbancia (540nm) vs glucosa (g·L⁻¹) para el medio Grimm-Allen (a) y YPD (b). Datos experimentales por duplicado.

Se construye una gráfica de glucosa vs. absorbancia y se obtiene el modelo con regresión lineal. Donde, Y= absorbancia (540nm), X= glucosa (g·L⁻¹), por lo cual

es necesario despejar la variable X, para a partir de la absorbancia determinar la cantidad de azúcar residual.

La figura 22 muestra las curvas estándar de glucosa vs absorbancia para los medio YPD y Grimm-Allen, así como las ecuaciones generadas para determinar la concentración de glucosa, a partir del valor de absorbancia. Los coeficientes de regresión fueron adecuados, dando confiabilidad en el cálculo de glucosa residual.

Nota: Recordar que la curva determina azúcar en un máximo de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo cual será necesario realizar una dilución del sobrenadante, para estar dentro del rango de la curva estándar, pues el medio contiene inicialmente $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Aislamiento de esporidias de *U. maydis*.

La metodología empleada demostró ser adecuada para el aislamiento de teliosporas de *U. maydis* y su posterior germinación para la formación de esporidias. Es necesario indicar que la técnica usada en este trabajo, no permite identificar las esporidias compatibles, sin embargo, al tener su origen de la germinación de gran número de teliosporas, asumimos que durante el cultivo se tienen de ambos tipos (alelos $a \neq$ y $b \neq$) y que crecieron de forma simultánea, pues para que se produzca la infección y formación de las agallas se requieren esporidias compatibles.

Al observar las esporidias al microscopio se confirmó que morfológicamente el material aislado corresponde a *U. maydis*, sin contaminación o presencia de otros organismos. Las esporidias, sobre medio PDA+cloramfenicol (Figura 23b) crecieron de forma abundante y mostraron una coloración café oscuro, aunque se sabe que las esporidias (Banuett, 1995) exhiben una variación en morfología, color, tamaño y forma de crecimiento, especialmente cuando son crecidas en medios artificiales (Christensen, 1963).

Las esporidias fueron conservadas en refrigeración y transferidas a medio nuevo cada 40 días.

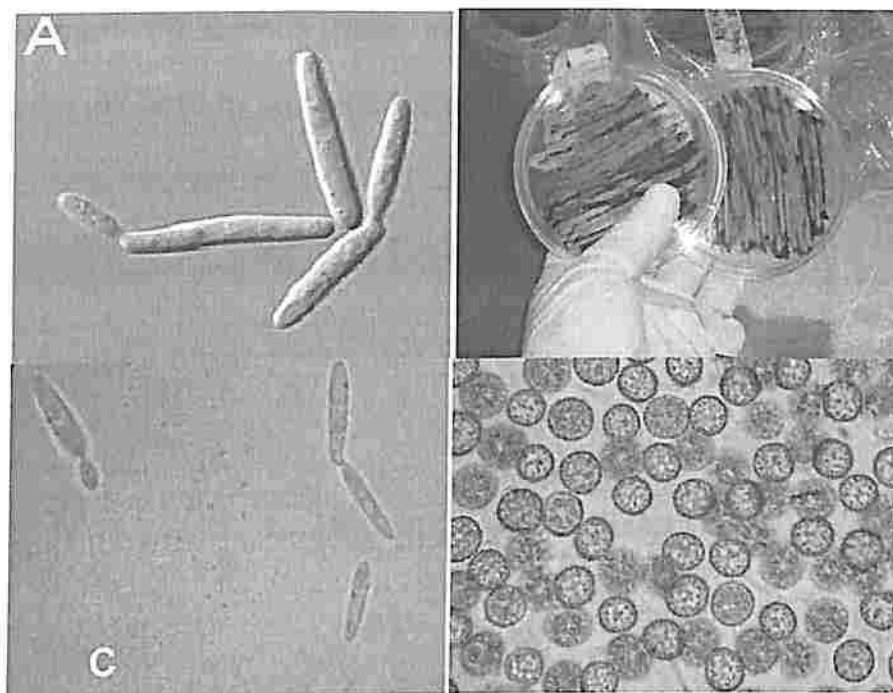


Figura 23. A) Esporidias de *U. maydis* tomada de Fuchs et al. (2005), para comparar con el material aislado en este trabajo. B) Apariencia de la cepa silvestre aislada, en medio sólido PDA. C) Morfología de la esporidia silvestre aislada. D) Morfología de teliosporas antes de su germinación.

4.2 Crecimiento de esporidias de *U. maydis* en matraces agitados.

Esporidias de *U. maydis* crecidas sobre PDA que se sembraron en matraces con 50 mL de medio de cultivo (preinóculo) durante 24 h, para producir el preinóculo, mostraron que 24 h fueron suficientes para alcanzar una concentración adecuada (Figura 24B), tiempo que coincide con lo reportado en otros trabajos, que usan 16 a 24 h de crecimiento del preinóculo para sembrar matraces de mayor tamaño (Pataky y Chandler, 2003).

Desde la producción del preinóculo se presentaron diferencias, las esporidias crecieron con mayor rapidez en medio YPD y PDB, comparado con el medio Grimm-Allen. Lo anterior se ilustra en el Cuadro 9, pues aún cuando se utilizó el

mismo volumen (12.5 mL) para inocular los matraces de 500 mL, la concentración inicial (0 h) en estos fue distinta.

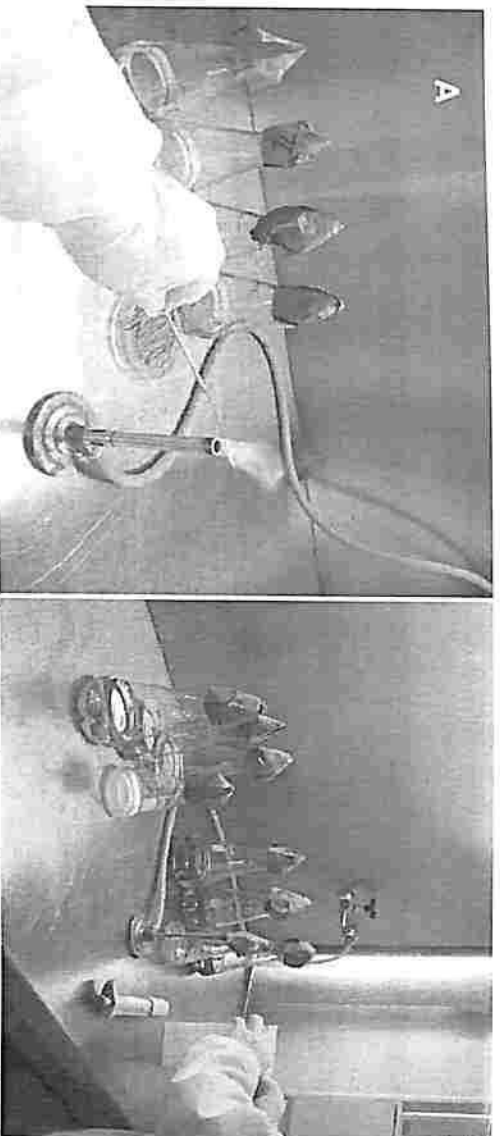


Figura 24. A) Inoculación de matraces de 250 mL con 50 mL de medio. B) Momento de inoculación de matraces de 500 mL con 250 mL de medio, usados para seguir la cinética, medio YPD y Grimm-Allen, todo bajo condiciones asépticas y dentro de una campana de flujo laminar.

Cuando se reproducen esporidias que se usaran para inocular mazorcas de maíz e inducir la formación de huilacoche, comúnmente se usa medio de cultivo sólido PDA (Agar-papa-dextrosa) (Villanueva *et al.*, 2007) o líquido PDB (Caldo de papa-dextrosa) (du Toit y Pataky, 1999a). Las esporidias se cultivan y se recuperan a las 72 y 24 h, respectivamente, y entonces se prepara una solución de esporidias (1×10^6 mL⁻¹, aprox.), denominado como “inóculo de huilacoche”. Por lo cual, interesa conocer la concentración de esporidias en las primeras horas de la fermentación.

El Cuadro 9, muestra el crecimiento de *U. maydis* en forma de peso seco (g·L⁻¹) y concentración de esporidias. Fueron YPD y PDB los medios que permitieron

producir mayor cantidad de esporidias en las primeras horas de cultivo, hasta cuatro veces la concentración alcanzada en Grimm-Allen después de 24h de cultivo. El cuadro sólo muestra datos hasta las 48 h, pues se considera que es el momento oportuno de recuperación de esporidias, debido a que no se conoce si el tiempo de cultivo afecta su capacidad de infección. Si el objetivo es obtener la mayor concentración de esporidias en el menor tiempo, el medio YPD resultaría el medio más efectivo, sin embargo hay que estudiar más profundamente el nutriente que origina los cambios morfológicos en las esporidias y la inhibición de la separación, hecho que se describe más adelante.

Cuadro 9. Comparación de medias de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y esporidias ($\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$) en tres medios de cultivo, en las primeras horas de fermentación, en matraces agitados de 500 mL con 250 mL de medio.

Concentración	Tiempo de cultivo		
	0 h	24 h	48 h
Esporidias ($\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$)			
YPD	0.526 a	52.53 a	56.36 b
Grimm-Allen	0.146 c	10.73 c	22.36 c
PDB	0.453 b	36.36 b	62.36 a
*D.M.S.	0.067	4.19	3.70
Biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			
YPD	0.78 a	2.22 a	2.89 a
Grimm-Allen	0.48 b	1.15 b	1.92 ba
PDB	0.72 a	1.59 ba	2.48 b
*D.M.S.	0.201	0.633	0.582

Media de tres repeticiones. Letras iguales en el sentido de la columna sin diferencia significativa, Tukey $\alpha=0.05$. *Diferencia mínima significativa.

El crecimiento de esporidias de *U. maydis* en términos de peso seco y concentración, se incrementó con el tiempo de cultivo en los tres medios y aproximadamente a las 138 h se alcanzó el máximo en biomasa y

concentración de esporidias. En los dos medios donde se estimó la glucosa residual, indicaron su consumo total aproximadamente después de 140 h.

La Figura 25 representa la cinética de crecimiento de esporidias *U. maydis* en el medio PDB, en el cual se alcanzó $5.74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peso seco y 131×10^6 esporidias $\cdot\text{mL}^{-1}$. En este medio, el incremento en biomasa correspondió a un aumento en la concentración de esporidias. La fase estacionaria de crecimiento fue evidente después de 120 h, y debido a la composición de este medio no se estimó la glucosa residual.

Por otro lado, en el medio YPD los valores máximos fueron $7.67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 65.3×10^6 esporidias $\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo, en este medio se perdió la relación entre biomasa y concentración (Figura 26), pues alrededor de las 40 h de fermentación la división de las esporidias se inhibió aun cuando la biomasa siguió incrementado debido a cambios en la morfología (tamaño) que al incremento en el número. La glucosa fue consumida totalmente a las 120 h, tiempo que corresponde con el fin de la fase logarítmica de crecimiento.

En Grimm-Allen (Figura 27) la biomasa máxima fue de $4.91 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que el número de esporidias superó los $150 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ al final del cultivo. El incremento en esporidias cambio lentamente al inicio del cultivo, pero aún con menor biomasa que los otros medios, la concentración de esporidias fue mayor al final, debido a que el tamaño de las esporidias en este medio fue menor, cuestión que se observó al realizar el conteo directo en la cámara Neubauer.

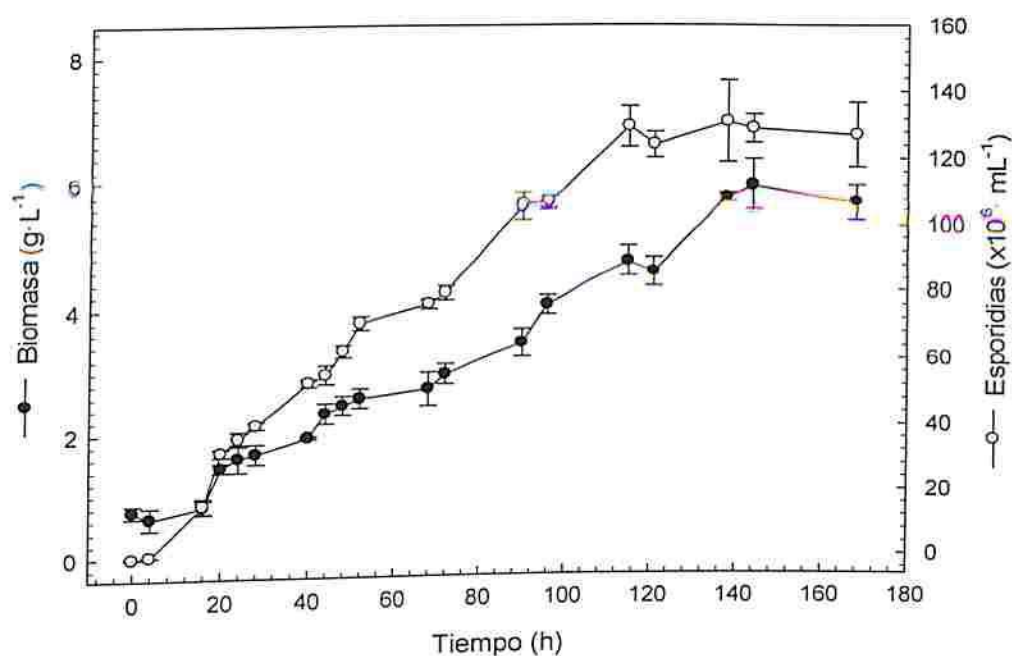


Figura 25. Biomasa, concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo PDB. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.

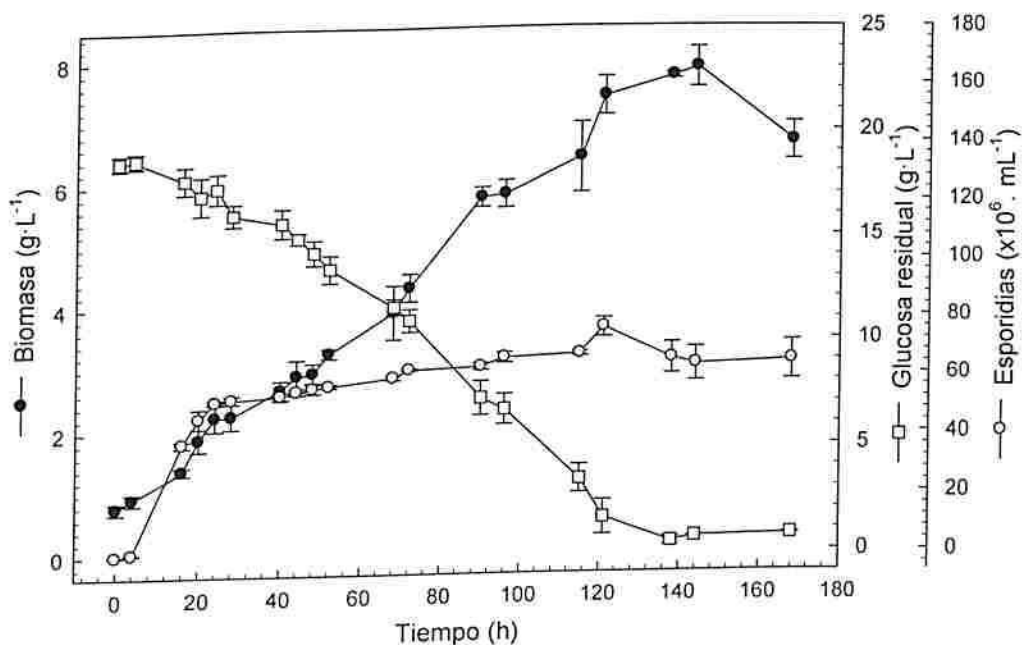


Figura 26. Biomasa, azúcar residual y concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo YPD. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.

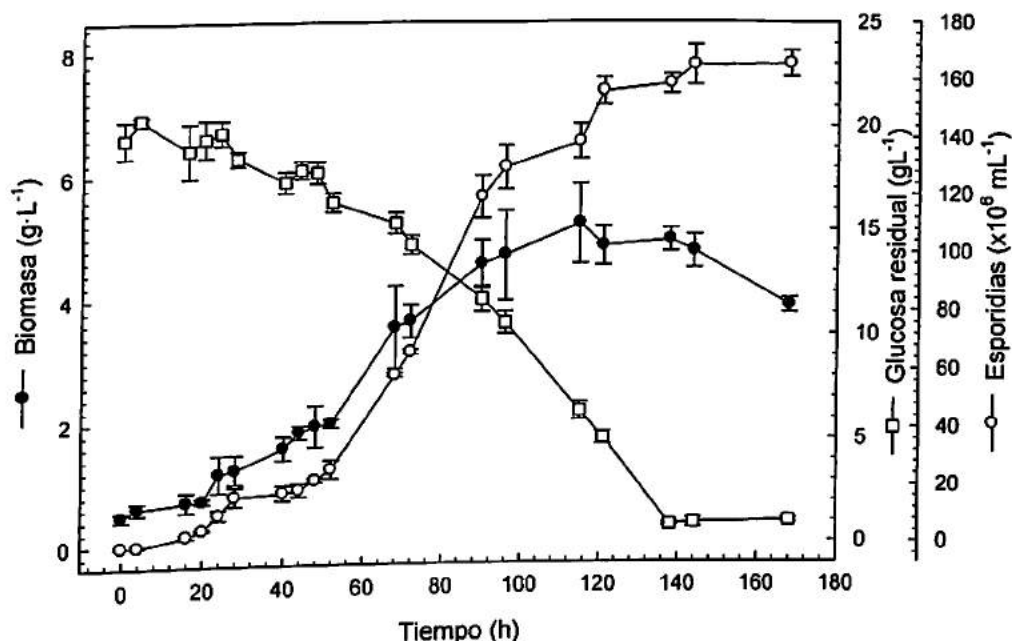


Figura 27. Biomasa, azúcar residual y concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo Grimm-Allen. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.

Al igual que en YPD, en Grimm-Allen, la glucosa fue consumida totalmente alrededor de las 140 h de cultivo. Sin embargo, en este medio en las primeras horas la glucosa se consumió más lentamente que YPD, lo que tiene relación con un mayor incremento en biomasa y concentración de esporidias en YPD durante las primeras horas de fermentación.

En otros trabajos, el crecimiento de esporidias de *U. maydis* no se ha reportado de forma amplia, sin embargo, con lo reportado se puede inferir los resultados son congruentes a los de otros trabajos, los cuales no tienen como objetivo caracterizar el crecimiento celular, sino la actividad de alguna enzima o producción de un algún metabolito. Desde luego que los resultados se sujetan a las condiciones y tipo de medio de cultivo.

Por ejemplo, Budde y Leong (1989) al cultivar esporidias, alcanzaron 7.2 g·L⁻¹ de biomasa, después de 168 h de cultivo, en un medio deficiente en Fe⁺. Kim

et al. (2001) reportó una concentración de aproximadamente 140×10^6 esporidias/mL, después de 36 h en medio compuesto de 2 % glucosa, 20 mM NH_4NO_3 , y solución de sales. Cornejo-Mazón *et al.* (2007), utilizaron la cepa FBD12 y un arreglo experimental de Taguchi para optimizar la producción de biomasa en el medio YPD, en el cual obtuvieron $15.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que en el mismo medio nosotros obtuvimos $7.67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, es decir, la mitad. Sin embargo, en dicha investigación se utilizó el doble de concentración de glucosa ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Además, concluyeron que las variables más importante en la producción de *U. maydis* son la agitación y el pH. Por lo cual, a nivel de matraces ajustamos el pH inicial de los medios de cultivo fue ajustado a 7.2 (Figura 28), valor que ha sido considerado como óptimo en para el cultivo del hongo en un sistema discontinuo (lote) (Drews *et al.*, 2004).

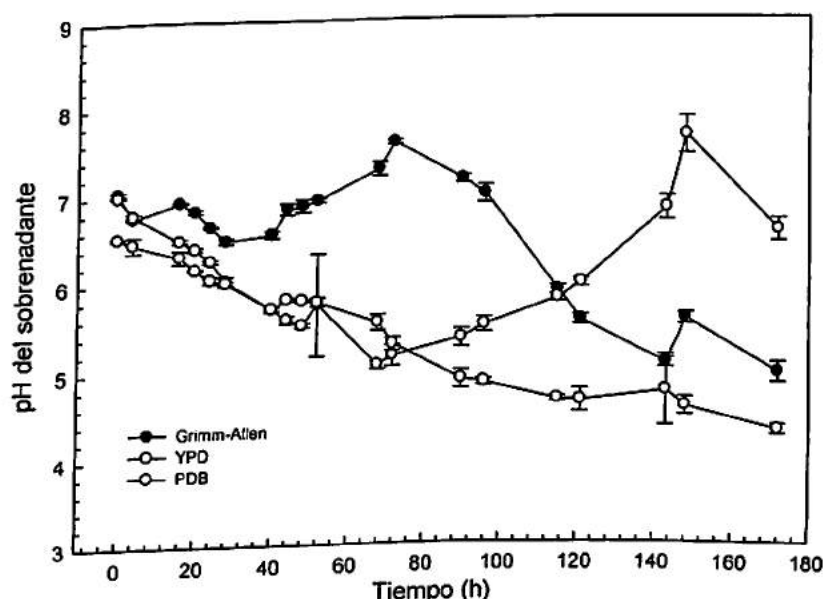


Figura 28. Cambio de pH en los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de esporidias de *U. maydis*. Media $\pm$ DS de tres repeticiones.

Después de la esterilización el pH se modificó y con el transcurso del tiempo de cultivo, mostró una tendencia a disminuir, particularmente en el medio PDB. Para Grimm-Allen, aunque al principio se incrementó el valor, al final también disminuyó. Caso contrario, el medio YPD disminuyó al inicio, pero después de las 72 h, sufrió un incremento considerable y finalizó en un valor similar al inicial.

4.3 Efecto del medio de cultivo sobre la morfología de *U. maydis* en matraces agitados.

Se sabe que en organismos unicelulares su crecimiento es resultado de su división, es decir, el cambio en biomasa representa un cambio en la concentración celular. Sin embargo, cuando se trata de hongos, la situación es un poco diferente, su crecimiento se debe al incremento en el tamaño y densidad (Bailey y Ollis, 1986). Por lo anterior, la relación entre la biomasa y la concentración de esporidias (Figura 29) puede ser un indicativo de los cambios morfológicos de *U. maydis* durante el cultivo.

Sólo el medio PDB conservó una tendencia lineal, lo que puede indicar poca modificación en la morfología de las esporidias. Una relación lineal se conservó hasta alcanzar una biomasa de $2.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (30 h) y $3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (65 h) en el medio YPD y Grimm-Allen, respectivamente. En el medio Grimm-Allen las esporidias disminuyeron su tamaño, hecho que se observaba al momento de realizar el conteo (Figura 29), además de que las esporidias comenzaban la formación de otra, incluso antes de terminar de separarse.

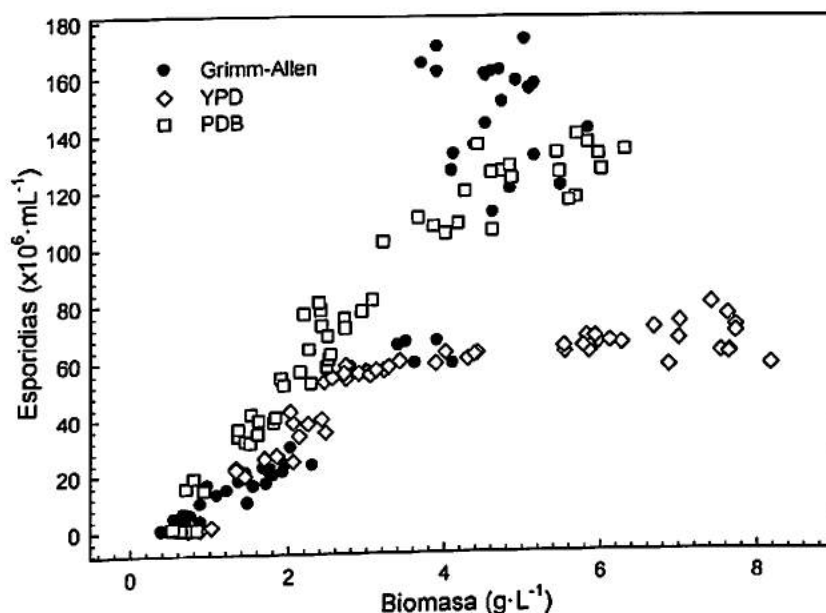


Figura 29. Relación entre biomasa vs concentración de esporidias de *Ustilago maydis*. Media de tres repeticiones.

Por otro lado, en el medio YPD las esporidias se alargaron y engrosaron, formándose inclusive septas en las esporidias. Lo anterior implicó la disminución de la división de las esporidias. La inhibición en la separación de las esporidias ocurrida en el medio YPD se puede atribuir a deficiencias en la síntesis de proteínas, pues se ha sugerido que ciertas proteínas (Don1 y Don3) comienzan la formación del brote de la esporidia y son esenciales para su posterior separación (Weinzierl *et al.*, 2002). Al respecto, Weber *et al.* (2003) para identificar la función de la proteína Myo5 en *U. maydis*, crearon mutantes a los que les suprimieron su capacidad para sintetizar dicha proteína, encontraron que si ésta no se sintetiza, las esporidias son viables pero crecen lentamente (tiempo de división de una cepa control en medio líquido fue 2 h a 28 °C, mientras que para la mutante fue 6.48 h), además, en contraste a la morfología de células elongadas y regulares de un aislamiento silvestre, las células

mutantes fueron mucho más gruesas y usualmente no se separan, formando largos agregados celulares que son divididos por una septa. Aunque algunas células de la periferia de estos agregados conservan su crecimiento polarizado, sin embargo, las más viejas pierden su polaridad y comienzan a hacerse esféricas.

Lo anterior ocurrió en el medio YPD, después de 48h comenzaron un alargamiento y disminuyeron su proceso de división, por lo cual el incremento en biomasa no corresponde a un incremento en la concentración (Figura 29). Esto hace suponer que en este medio la fuente de Nitrógeno pudo no ser suficiente para garantizar la síntesis de proteínas necesarias para la separación celular. Sin embargo, se observan algunos brotes o indicios de separación de esporidias (Figura 30) que no terminan por separarse. Sin embargo, hace falta evaluar la relación C:N y entonces concluir si la deficiencia de nitrógeno determinan los cambios morfológicos y la baja división celular.

Por otro lado, Saavedra *et al.*, (2003) encontraron que la proteína Concanavalina A tiene un discreto efecto activador sobre el crecimiento de las esporidias de *U. maydis*. Las basidiosporas o esporidias, que normalmente son delgadas y alargadas, se transformaron en estructuras más largas y con engrosamiento en algunas zonas que ocasionan deformaciones, sin embargo presentaron múltiples ramificaciones y mayor gemación.

La figura 31 ilustra la morfología de las esporidias de *U. maydis* crecidas en medio Grimm-Allen, en este medio también hubo algunos cambios morfológicos, pero especialmente una disminución en el tamaño de las

esporidias, además de la formación de agregados celulares, que evidencian una mayor división o gemación de las esporidias, comparado con los otros medios.

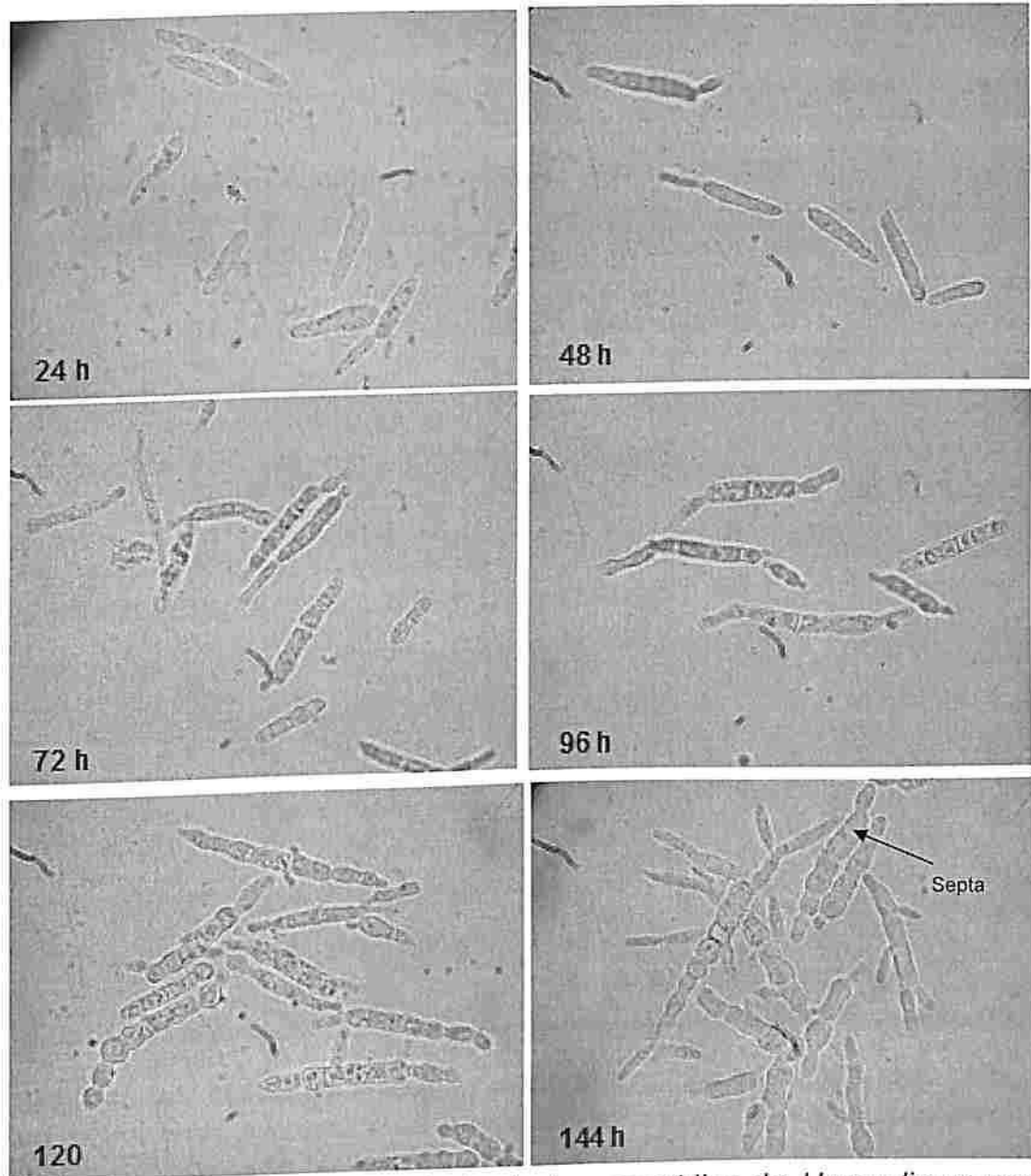


Figura 30. Cambios en la morfología de las esporidias de *U. maydis* en medio YPD en matraces agitados, a diferentes tiempos de cultivo. A 24 h de cultivo las esporidias tienen una forma característica, pero después de 72 h se alargamiento es evidente y se presentan ya las septas, es decir no se concluye la separación de las esporidias.

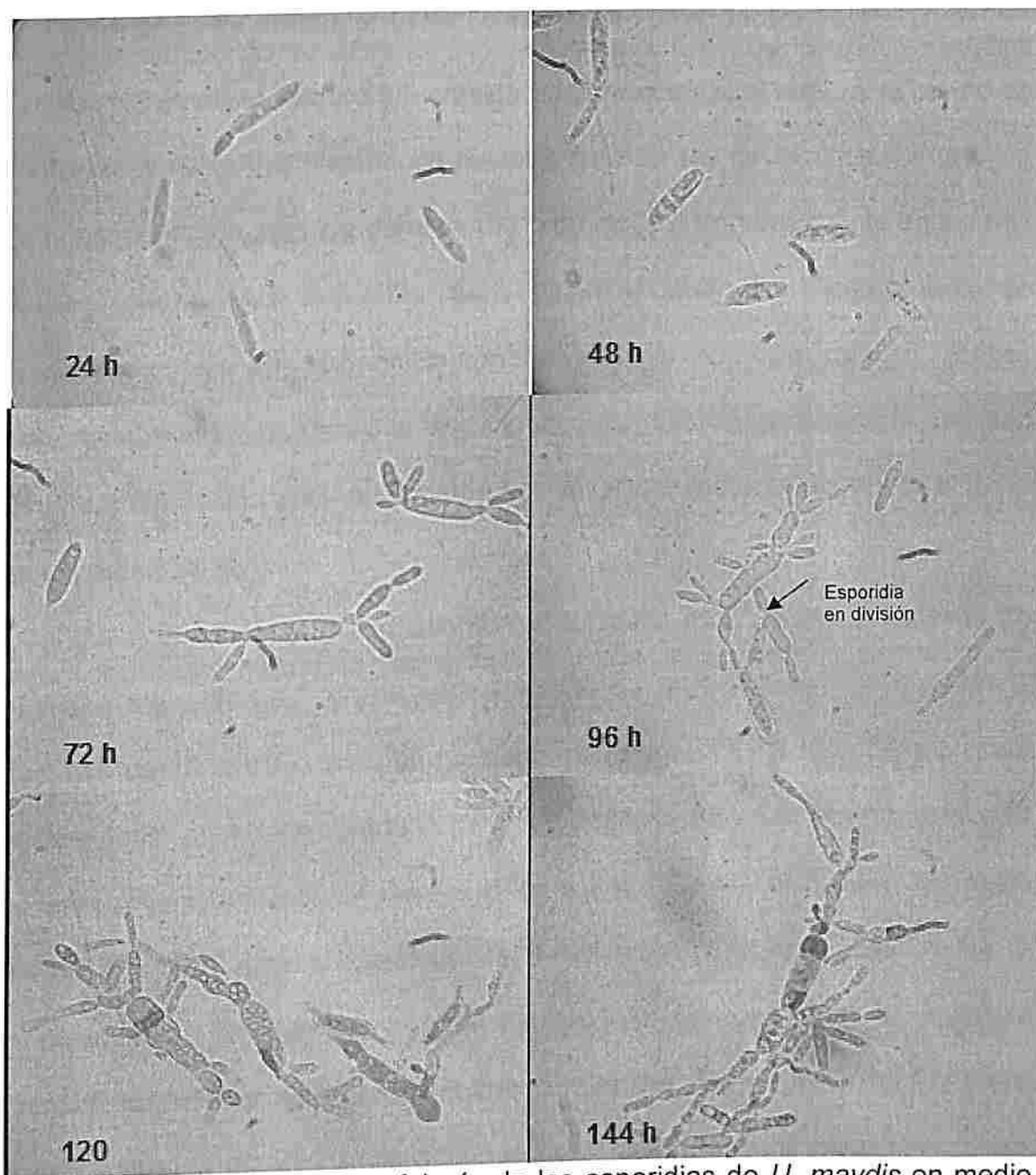


Figura 31. Cambios en la morfología de las esporidias de *U. maydis* en medio Grimm-Allen en matraces agitados, a diferentes tiempos de cultivo. En este medio de cultivo la separación de esporidias se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo, sin embargo se apreciaron ciertos agrupamientos de esporidias, con un tamaño menor comparado con el inicio del cultivo.

4.4 Cinética de crecimiento de *U. maydis* en Biorreactor.

El aislamiento de *U. maydis* fue crecida en bioreactor para evaluar el efecto de condiciones de cultivo teniéndose mayor control de los parámetros. La cinética de crecimiento fue seguida durante 100 h de cultivo. Aparentemente en los tres medios fue tiempo suficiente para alcanzar una fase estacionaria de crecimiento. Las condiciones fueron 2 vvm, 28 °C, 150 rpm y 7.2 pH, adicionalmente se monitoreó el oxígeno disuelto (OD) sin embargo, la cantidad de aire y agitación usada provocaron que el OD se redujera del 100% al 3-4% en las primeras 36 h.

La Figura 32 muestra el crecimiento en el medio PDB donde el máximo de biomasa fue $6.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una concentración de 89.1 millones de esporidias, después de 72 h de cultivo. La biomasa máxima en YPD fue $7.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ que correspondió a $74.6 \text{ esporidias (}\times 10^6 \text{ /mL)}$, después de 96 h, tiempo en el cual se consumió totalmente la glucosa (Figura 33). Para Grimm-Allen los datos fueron $4.86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ que correspondió a $104 \text{ esporidias (}\times 10^6 \text{ /mL)}$, después de 72 h de cultivo. En este medio, la glucosa se consumió en su totalidad aproximadamente a las 100 h de cultivo (Figura 34). En el medio YPD ($7.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) se alcanzó la mayor cantidad de biomasa, pero la mayor concentración de esporidias ocurrió en Grimm-Allen ($104 \times 10^6 \text{ /mL}$), debido a que en YPD la división celular se inhibió y las esporidias cambiaron morfológicamente, esto fue similar a lo encontrado en matraces agitados. En Grimm-Allen se produjeron hasta 50 millones de esporidias más, pero con menor biomasa que los medios YPD y PDB.

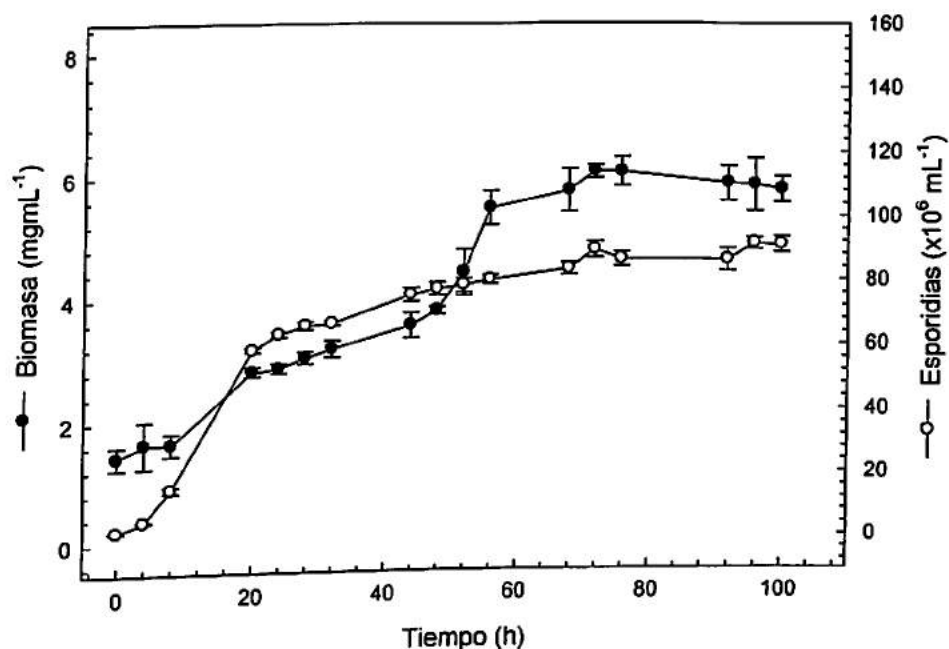


Figura 32. Biomasa, concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo PDB. Las condiciones de cultivo fueron 150 rpm, 7.2 pH, 2 vvm, 28 °C. Media $\pm$ DS de dos repeticiones, con muestreo por triplicado (6 valores).

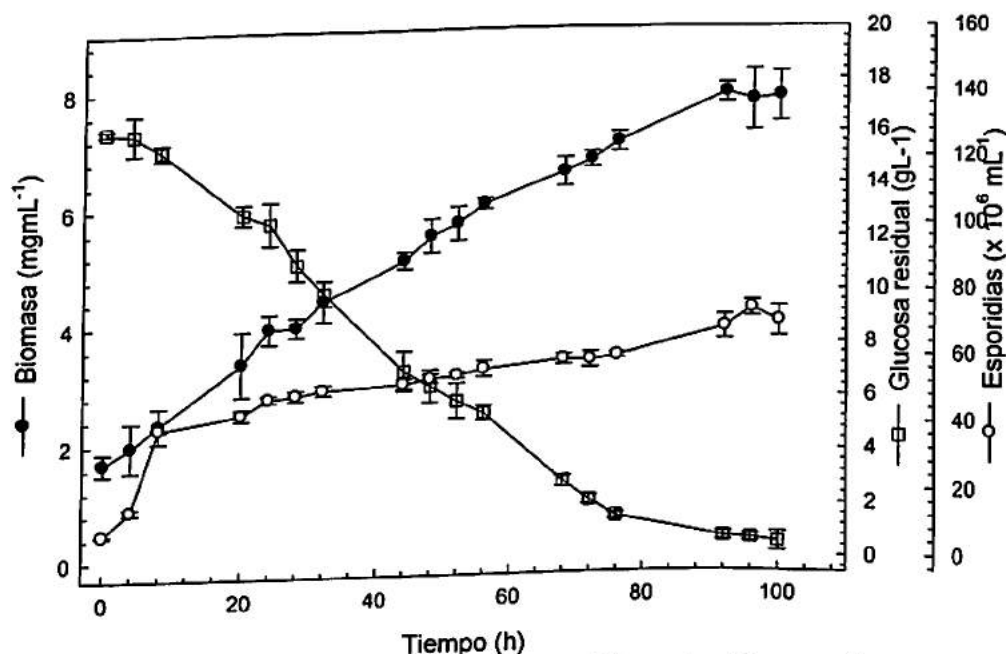


Figura 33. Biomasa, concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo YPD. Las condiciones de cultivo fueron 150 rpm, 7.2 pH, 2 vvm, 28 °C. Media $\pm$ DS de dos repeticiones, con muestreo por triplicado (6 valores).

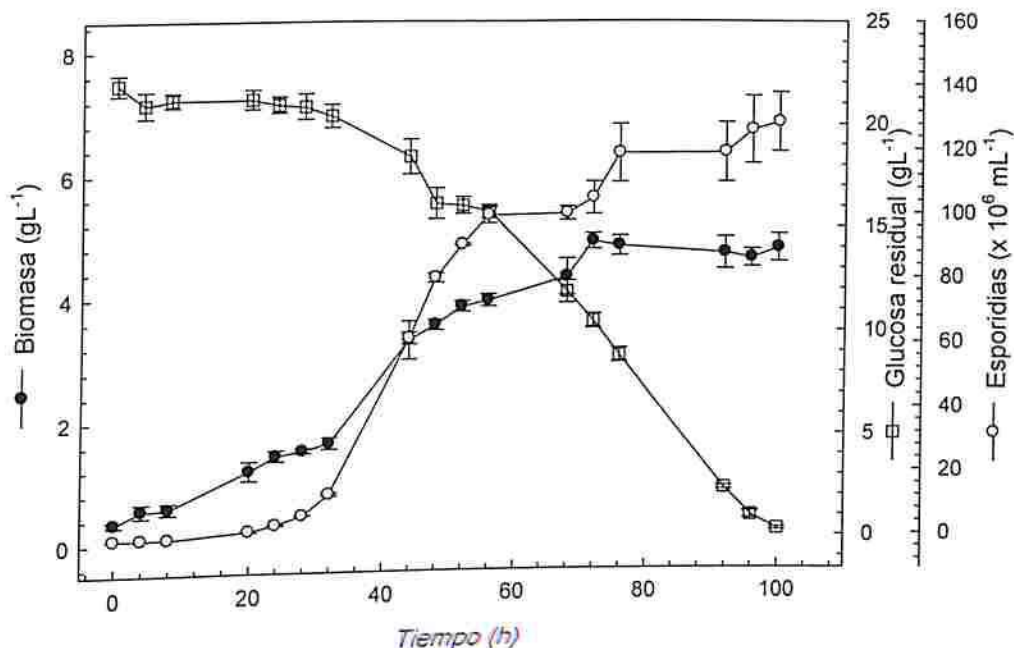


Figura 34. Biomasa, concentración de esporidias de *U. maydis* en medio de cultivo Grimm-Allen. Las condiciones de cultivo fueron 150 rpm, 7.2 pH, 2 vvm, 28 °C. Media $\pm$ DS de dos repeticiones, con muestreo por triplicado (6 valores).

Los resultados en la cinética de *U. maydis* en biorreactor para cada medio, son muy parecidos a los encontrados en matraces agitados, debido a que las condiciones usadas en biorreactor no fueron muy diferentes.

Existen limitadas investigaciones sobre el crecimiento de *U. maydis* en biorreactor, sin embargo, podemos mencionar algunos datos congruentes a los encontrados en este trabajo. Por ejemplo, Drews y Kraume (2001) cultivaron *U. maydis* en medio de cultivo Grimm-Allen, alcanzaron una biomasa máxima de $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, un valor mayor al encontrado en nuestro trabajo, sin embargo estos autores emplearon un valor de 60% de OD y una concentración inicial de $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa, es decir mayor oxigenación y sustrato. Por otro lado, Sánchez-Marroquín *et al.*, (1970) evaluaron la producción de lisina por *U. maydis* empleando biorreactores de diferentes tamaños y distintos medios. Bajo

las condiciones usadas, obtuvieron un máximo de 7.7 g·L⁻¹ de biomasa (peso seco) y una producción de 2.61 gL⁻¹ de lisina en las primeras 72 h de fermentación.

4.5 Cálculo de parámetros cinéticos del crecimiento de *U. maydis*

Se estimó la velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$), el coeficiente de rendimiento de biomasa por sustrato ($Y_{X/S}$), velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s) y tiempo de duplicación (t_d) en matraces y biorreactor con datos experimentales. Para estimar la velocidad máxima de crecimiento $\mu_{\max}$, se graficaron de forma semilogarítmica los datos experimentales y de la fase de crecimiento logarítmica se estimó $\mu_{\max}$ mediante una regresión lineal y exponencial de ese periodo de tiempo (Figura 35), los modelos usados fueron:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad \text{y} \quad x = x_0 e^{(\mu t)}.$$

Donde x =biomasa (g·L⁻¹), t =tiempo (h), $\mu=\mu_{\max}$ (h⁻¹). El tiempo de duplicación (t_d =h⁻¹) se determinó con la eq. 4 y la eq. 7 fue utilizada para determinar la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s =g·L⁻¹·h⁻¹) bajo la suposición de que coeficiente de mantenimiento (m_s) es pequeño como para no considerarlo. Se empleó la *velocidad específica de crecimiento* μ en fase de crecimiento o logarítmica.

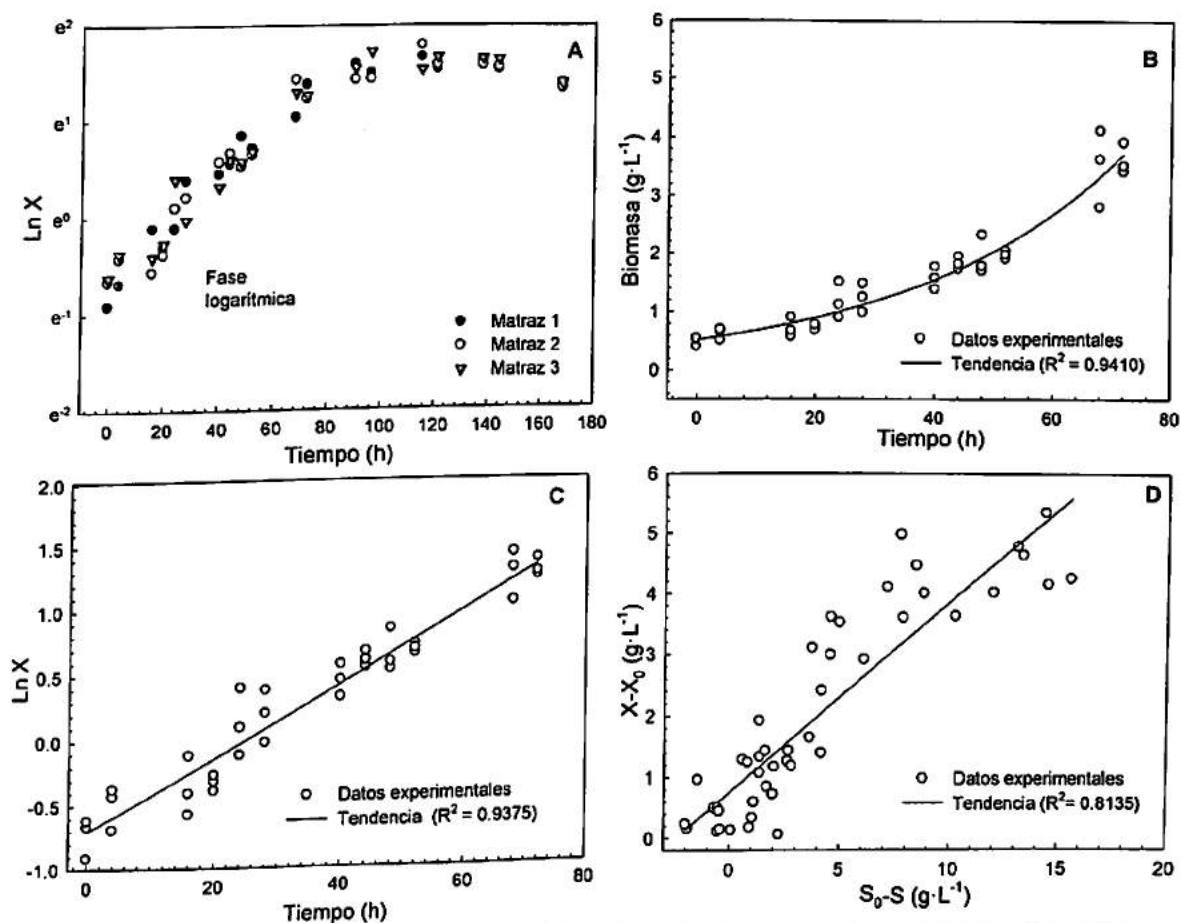


Figura 35. A) Gráfica semilogarítmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logarítmica para estimar $\mu_{\max}$. C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logarítmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar $Y_{s/x}$. Datos experimentales de tres repeticiones.

El cuadro 10 muestra los valores experimentales de velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$) y el coeficiente de rendimiento ($Y_{x/s}$) para los tres medios de cultivo tanto en biorreactor como en matraces. Tanto en matraz como en biorreactor, el valor más alto de $\mu_{\max}$ se obtuvo en el medio Grimm-Allen. En los tres medios, el valor de este parámetro fue ligeramente mayor en biorreactor comparada con lo obtenido en matraces agitados.

Cuadro 10. Valores de velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$), coeficiente de rendimiento ($Y_{x/s}$), velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s) y tiempo de duplicación (t_d), de la producción de esporidias en matraz y biorreactor, en los tres medios de cultivo, estimados a partir de la biomasa ($g \cdot L^{-1}$).

Sistema	Parámetro	Medio			
		PDB		YPD	Grimm-Allen
Matraz	$\mu_{\max} (h^{-1})$	[0.0161]	(0.0206)	[0.0177] (0.0210)	[0.0274] (0.0281)
	$Y_{x/s}$	-----		0.3345	0.3103
	$r_s (g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$	-----		0.2798	0.327
	$t_d (h)$	33.64		31.65	24.6
Biorreactor	$\mu_{\max} (h^{-1})$	[0.0202]	(0.0214)	[0.0194] (0.0228)	[0.0406] (0.0450)
	$Y_{x/s}$	-----		0.3373	0.3228
	$r_s (g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$	-----		0.4021	0.545
	$t_d (h)$	32.39		30.40	15.40

() Valores de $\mu_{\max}$ determinados con $\ln X$ vs tiempo, [] $\mu_{\max}$ determinada con modelo exponencial.

La velocidad específica de crecimiento de *U. maydis* bajo las condiciones establecidas, son bajas, sin embargo cuando se trata de hongos comúnmente los valores de μ son bajos. Por ejemplo el hongo *Paecilomyces sinclairii* (Kim *et al.*, 2003) mostró valores de 0.048, 0.060 y 0.154 h^{-1} a 0.5, 1.5 y 3.5 vvm, respectivamente. Lo anterior también pone en evidencia que la aireación tiene un efecto positivo sobre la velocidad específica de crecimiento. Los valores de la velocidad específica de crecimiento son bajos, pero es importante notar que las variables de agitación y aireación empleados son de igual forma bajos, no obstante se encontraron datos que pueden servir como base para comenzar la exploración del uso de otros valores de estas variables del sistema de cultivo. Por otro lado, los coeficientes de rendimiento Y_{xs} que fue de alrededor de 0.33 $g \cdot g^{-1}$, son muy similares entre los medios y entre los sistemas utilizados, esto

puede ser explicado por el hecho de que los medios de cultivo empleados contenían cantidades de sustrato en proporciones muy similares.

El valor de los parámetros cinéticos encontrados para *U. maydis* son similares a los reportados por Drews y Kraume (2002), quienes emplearon un biorreactor y el medio Grimm-Allen, encontraron un valor de $\mu_{\max} = 0.19\text{h}^{-1}$ y $Y_{\text{xs}}=0.35$. Aunque su valor de $\mu_{\max}$ mucho mayor al del presente trabajo, también reportaron velocidades específicas de crecimiento menores a 0.05h^{-1} .

4.6 Confrontación de los resultados y los trabajos de inoculación.

La producción de esporidias de *U. maydis* se reproducen en medio de cultivo sólido PDA (Villanueva *et al.*, 2007) o líquido PDB (dU Toit y Pataky, 1999), y se recuperan a las 72 y 24 h, respectivamente, y se prepara una solución de esporidias (1×10^6 , aprox.) llamada "inóculo de huitlacoche". Crear esporidias en medio líquido permite su dilución directa para formar una suspensión a la concentración deseada. El seguir la cinética de crecimiento durante más tiempo permitió conocer los valores máximos de producción y evidenciar cambios morfológicos en la esporidia. Con el tiempo de cultivo se apreciaron cambios morfológicos después de 48 h de crecimiento, los que podría implicar un aspecto negativo en su capacidad de infección, sin embargo no se ha investigado al respecto. Por lo cual es necesario tener datos de cinética de crecimiento, para tenerlos como base de posteriores investigaciones que permitan evaluar distintas variables y encontrar las mejores condiciones de producción de esporidias de *U. maydis*.

5. CONCLUSIÓN

Las esporidias de *Ustilago maydis* crecen en los tres medios de cultivo evaluados, tanto en matraces agitados y biorreactor. Se considera que 48 h de cultivo en momento adecuado para la recuperación de las esporidias.

El medio de cultivo YPD fue el que originó la mayor producción de biomasa, con respecto a los otros medios, con valores de $7.67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $7.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en matraz y biorreactor, respectivamente. Sin embargo, tuvo la menor concentración de esporidias, y es el medio con mayor cambio en morfología. El aumento en biomasa no correspondió al incremento en concentración después de 36 h aproximadamente.

La mayor concentración de esporidias fue en el medio Grimm-Allen, las concentraciones máximas fueron 150 y 104×10^6 millones de esporidias por mililitro en matraces agitados y biorreactor, sin embargo se tuvo la menor cantidad de biomasa comparada con la encontrada en los medios YPD y PDB.

En biorreactor se redujo el tiempo de cultivo a 100 h, tiempo en el cual se consumió totalmente la glucosa, y en matraz se consumió hasta las 140. En los resultados de biomasa, concentración de esporidias y variables cinéticas, no se encontró contundente evidente entre los sistemas utilizados

Los parámetros cinéticos de *velocidad máxima de crecimiento* fueron mayores en el medio Grimm-Allen, comparado con los otros medios de cultivo, y solo en este medio el valor en biorreactor comparado con lo encontrado en matraces agitados fue mayor.

Los resultados de encontrados permitirán comenzar a evaluar diferentes variables y determinar las mejores condiciones de producción de esporidias de *Ustilago maydis* para producir huitlacoche de forma comercial.

6. BIBLIOGRAFIA.

Agrios, G.N. 1998. Fitopatología. Ed. Limusa S.A. de C.V. 838 pp. México.

Arnold, C. 1991. Postharvest and marketing of cuitlacoche, the maize mushroom (*Ustilago maydis* – corn smut). Acta Horticulture 318: 321-324.

Bailey, J.E., D.F. OLLIS. 1986. Biochemical engineering fundamentals. McGraw Hill International. UK.984 pp.

Banuett, F., I. Herskowitz. 1989. Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5878-5882.

Banuett, F. 1992. *Ustilago maydis*, the delightful blight. TIG MAY 8:5 174-180.

Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annu. Rev. Genetics 29:179-208.

Banuett, F., I. Herskowitz. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122: 2965-2976.

Banuet, F., I. Herskowitz. 2002. Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Fungal Genetics and Biology. 37: 149-170

Basse, W. S., G. Steinberg. 2004. *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. Molecular Plant Pathology 5(2): 83-92

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

Budde, A.D., S.A. Leong. 1989. Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. Mycopathologia. 108:125-133

Cano-Canchola, C., L. Acevedo, P. Ponce-Noyola, A. Flores-Martínez, A. Flores-Carreón, C.A. Leal-Morales. 2000. Induction of lytic enzymes by the interaction of *Ustilago maydis* with *Zea mays* tissues. Fungal genetics and biology. 29:145-151

Casselton L.A., N.S. OLESNICKY 1998. Molecular Genetics of Mating Recognition in Basidiomycete Fungi. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (1): 55-70.

Castro, E. L., I. Ruiz. 2003. Huitlacoche: una delicadeza alimenticia que se puede producir en el valle del Yaqui. Instituto Tecnológico de Sonora. Perspectiva Universitaria 2: 27-28

Christensen, J.J. 1963 Corn smut caused by *U. maydis*. Monograph No. 2. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.

Cornejo-Mazon, M., M.E. Jaramillo-Flores, L. Villa-Tanaca, H. Hernández-Sánchez. 2007. Optimization of *Ustilago maydis* FBD12 biomass production using Taguchi methodology. *Journal of biotechnology*. 131S:S171-S187 (Abstract).

Desentis-Mendoza, R.M., H. Hernández-Sánchez, A. Moreno, Del C. E. Rojas, L. Chel-Guerrero, J. Ramariz, M.E. Jaramillo-Flores. 2006. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules*. 7:1845-1854

Drews, A., M. Kraume. 2006. On Maintenance Models in Severely and Long-Term Limited Membrane Bioreactor Cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (5): 892-903

Drews, A., M. Kraume. 2002. Influence of continuous membrane bioreactor operation on ferrichrome production using *Ustilago maydis*. *Desalination* 149: 261-266

Drews, A. 2004. Kontinuierliche Ferrichromproduktion mit *Ustilago maydis* im Membranbioreaktor. Ph.D. Thesis. TU Berlin. Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 246. VDI-Verlag.

Doran, P.M. 1998. Principios de la ingeniería de los Bioprocesos. Editoria Acribia S.A. pp 468. España.

dU Toti, L.J., and J.K. Pataky. 1999a. Variation associated with silk channel inoculation for common smut of sweet corn. Plant Dis., 83:727-732.

dU Toit, L.J., and J.K. Pataky. 1999b. Effects of silk maturity and pollination on infection of maize ears by *Ustilago maydis*. Plant Dis. 83:621-626

Fuchs, U., I. Manns and G. Steinberg. 2005. Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Molecular Biology of the Cell 26:2746-2758.

Gold, E. S., M.S. Bragdon, E.M. Mayorga and W.J. Kronstad. 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.

Guevara-Lara, F., M.E. Valverde y O. Paredes-Lopez. 2000. Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (huitlacoche) strains on maize related to in vitro production of indol-3-acetic acid?. World journal of microbiology & biotechnology. 16:481-490.

Henry, M.J., H.D. Sisler. 1979. Effects of miconazole and dodecylimidazole on sterol Biosynthesis in *Ustilago maydis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 15(4):803-807.

- Kahmann, R., C. Basse and M. Feldbrügge. 1999. Fungal-plant signaling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Microbiology*. 2:647-650
- Kahmann, R., J. Kämper. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New phytologist* 164: 31-42
- Kealey, S., V.F. Kosikowski. 1981. Corn Smut as a food source. Perspectives on biology, composition and nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15:321-351
- Kim. S.H., J.W. Kronstand, B.E. Ellies. 2001. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry*. 58:849-857.
- Kim, S.W., H.J. Hwang, C.P. Xu, J.W. Choi and J.W. Yun. 2003. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology* 36:321-326
- Kronstad, W. J. 2003. Castles and cuitlacoche: the first international *Ustilago* conference. *Fungal Genetics and Biology* 38:265-271.
- Lizzarraga-Guerra, R. y M.G. Lopez. 1996. Content of Free Amino Acids in Huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Journal Agric. Food Chem.* 44:2556-2559

- Martínez, M.L., C. Villanueva y J. Sahagun. 2000. Susceptibilidad y resistencia del maíz al hongo comestible Huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) mejorando su virulencia. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6(2):241-255.
- Martínez, V.M., J. Osasuna, O. Paredes-López, F. Guevara. 1997 Production of indol-3-acetic acid by several wild-type strains of *Ustilago maydis*. *World journal of microbiology & biotechnology*. 13:295-298.
- Orth, A.B., M. Rzhetskaya, E.J. Pell, M. Tien. 1995. A serine (Threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6):2341-2345
- Paredes, L.O. 2000. Tecnologías para la producción masiva de huitlacoche. SEP- CONACYT. Pp.35. Recuperado de:
- Paredes, L.O. 2001. Caviar de los pobres, exquisitez culinaria. *La jornada*, México, septiembre 10 de 2001.
- Pataky, J., M. Chandler. 2003. Production of huitlacoche, *ustilago maydis*: timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia* 95(6):1261-1270
- Pataky, J.K. 1991. Production of huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Corda) on sweet corn. *HortScience* 26 (11):1374-1377.

Pataky , J.K. 2002. Production of huitlacoche *Ustilago maydis* using inoculation techniques developed to screen reactions of sweet corn to common smut. The 4thICMBMP.

Perez, M. A., 1999. Evaluación de la reacción de 300 familias de maíz (*Zea mays*) al huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Cda.) Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 98p.

Pope, D.D., S.M. McCarter. 1992. Evaluation of inoculation methods for inducing Common Smut on corn ears. *Phytopathology*, 82:950-955

Puhalla, J.E. 1968. Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Department of Genetics, The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Connecticut.

Quitero, R.R. 1981. Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones. Alambra Mexicana. México, 332p.

Rámos, C.L.E., G. Guerra-Sánchez, A. Marin-Hernández, R. Moreno-Sánchez y E. Saavedra. 2005. Caracterización cinética de las enzimas glucolíticas de *Ustilago maydis*. Memoria del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Oaxaca, Oax.

Ruiz, H. I., E. L. Castro. 2001. Efecto del Sitio de Inoculación artificial de *Ustialgo maydis* (D.C.) Corda en la producción de huitlacoche en híbridos de

maíz (*Zea mays* L.) en el Valle del Yaqui. ITSON-DIEP 3 (10): 127-128
(Resumen)

Ruiz, H. J., A. D. Martínez. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *Internatl Microbiol.* 1:149-158

Saavedra, H.E., S.A. Pérez, C.E. Pérez, A.F. Córdoba. 2003. Efecto de la Concanavalina A en el cultivo del fitopatógeno *Ustilago maydis*. *Interciencia.* 28(5):276-280

Sánchez-Marroquin, A., M. Ledezma and R. Carreño. 1970. Sugar substrates for L-lysine fermentation by *Ustilago maydis*. *Applied Microbiology* 20(5):687-692

Sánchez-Martínez, C., J. Pérez-Martin. 2001. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* y *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. *Microbiology*, 4:214-221

Sherald, J.L., H.D. Sisler. 1970. Antimycin A-resistant respiratory pathway in *Ustilago maydis* and *Neurospora sitophila*. *Plant physiol.* 46:180-182. Short communication.

Sierra-Campos, E., A. Villavicencio-Quijeiro, I. Velazquez, J.P. Pardo. 2005. Activación y función de la oxidasa alterna mitocondrial de *Ustilago maydis*. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. 13-18 noviembre de 2005.

- Snetselaar, K.M., M.A. Carlioli and K.M. Cordisco. 2001. Pollination can protect maize ovaries from infection by *Ustilago maydis*, the corn smut fungus. *Can J. Bot.* 79:1390-1399.
- Snetselaar, K.M., AND C.W. Mims. 1993. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology.* 83:843-850
- Spoeckner, S., V. Wray, M. Nimtz, S. Lang. 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 51:33-39
- Steinberg, G., J. Perez-Martin. 2007. *Ustilago maydis*, a new model system for cell biology. *Trends in Cell Biology* 18(2):61-67.
- Thakur, R.P., K.J. Leonard and J.K. Pataky. 1989. Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 73:921-925
- Valverde, M.E., P.F. Moghanddam, M.S. Zavala-Gallardo, J.K. Pataky, O. Paredes-Lopez y W.L. Pedersen. 1993. Yield and Quality of Huitlacoche on Sweet Corn Inoculated With *Ustilago maydis*. *HortScience* 28(8):782-785
- Venegas, P.E., M.E. Valverde, O. Paredes-Lopez, and J.K. Pataky. 1995. Production of the Edible Fungus Huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of Maize Genotype on Chemical Composition. *Journal of fermentation and bioengineering* 80: 104-106.

Villanueva, C. 1997. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food in Mexico. MICOL. NEOTROP. APL. 10:73-81

Villanueva, C., D. Cruz, J.D. Molina, F. Castillo and E. Savaleta. 1999. Artificial induction of "huitlacoche"

Villanueva, C., R. Sánchez, S. Villanueva. 2007. El huitlacoche y su cultivo. Ed. Mundi prensa. Pp. 96.

Villanueva, V.C., 2002. El huitlacoche, Mexicanísimo hongo del maíz. In: Kurczyn V. S.C. (ed). El festín de los hongos. México.

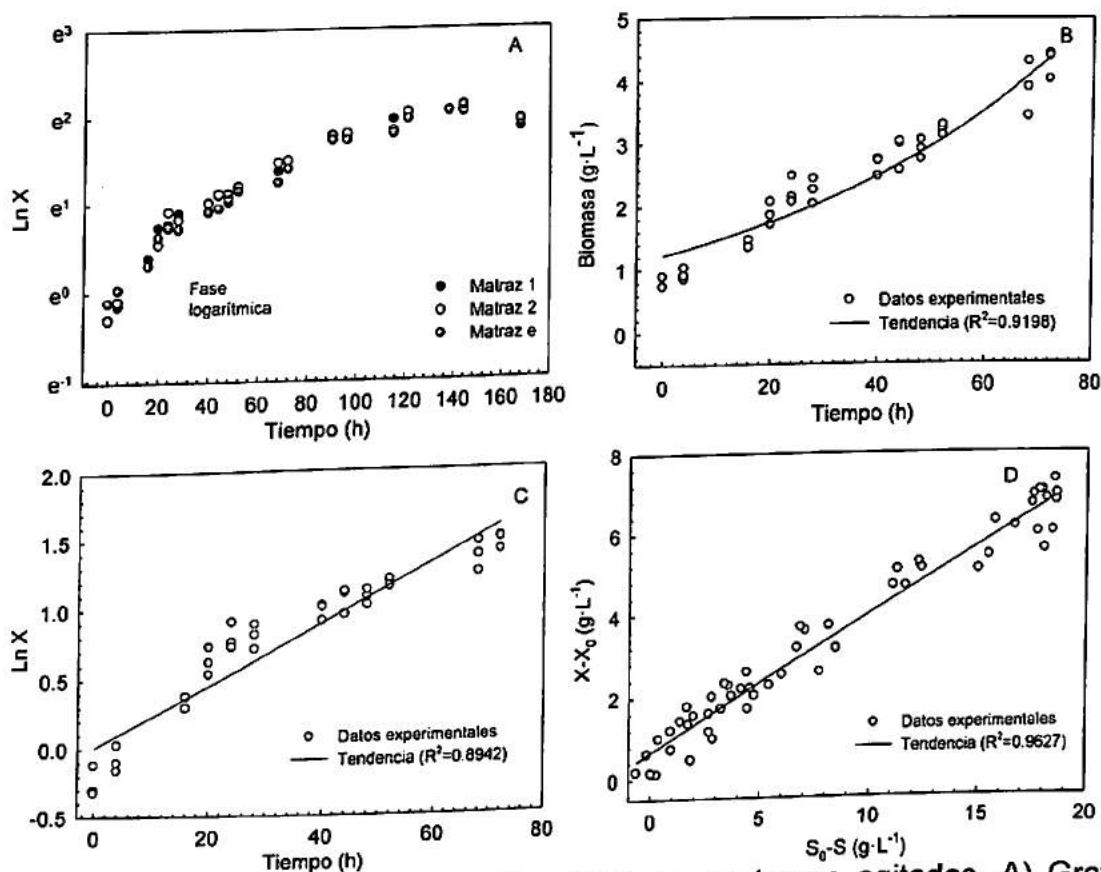
Wang, J., A.D. Budde, S.A. Leong. 1989. Analysis of ferrochrome biosynthesis in the Phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*: Cloning of an ornithine N5-oxygenase Gene. Journal of bacteriology. 171(5):2811-2818

Weber, I., C. Gruber, G. Steinberg. 2003. A class-V myosin required for mating, hyphal growth and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. The Plant Cell, 15:2826-2842

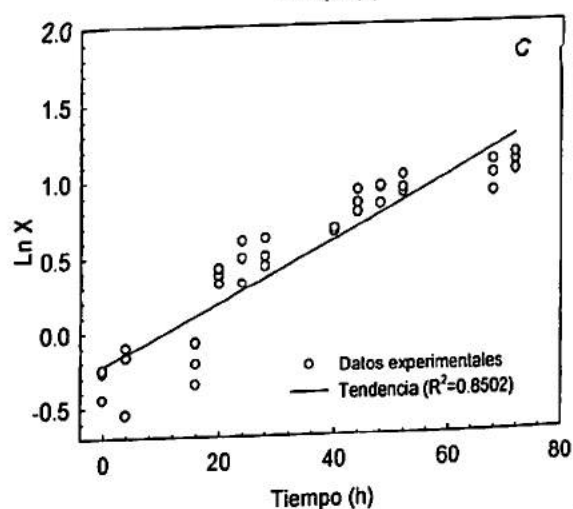
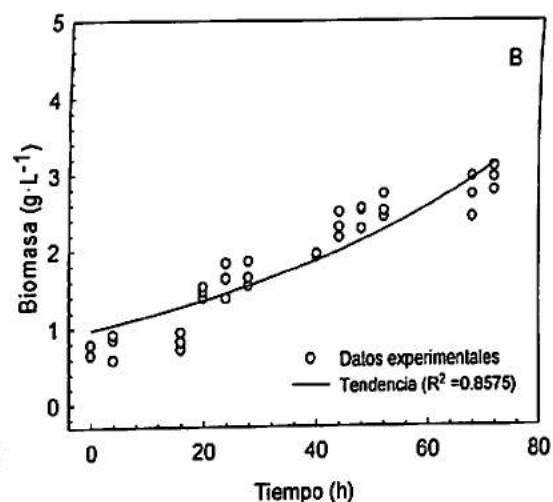
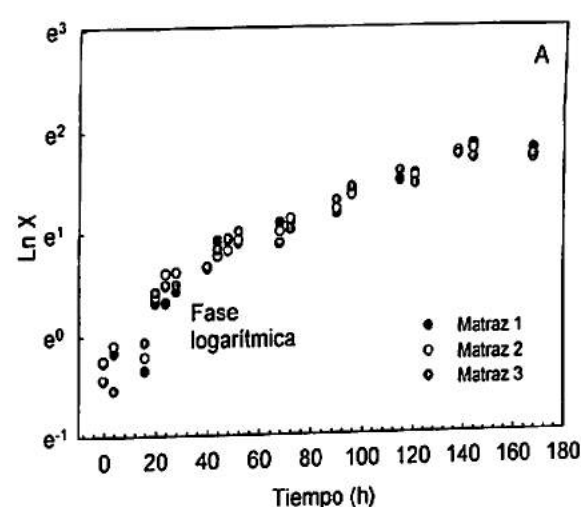
Weinzierl, G., L. Leveleki, A. Hassel, G. Kost, G. Wanner and M. Bölker. 2002. Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. Molecular Microbiology 45(1):219-231.

Ziogas, B.N., S.G. Georgopoulos. 1980. Choramphenicol-induction of a second cyanide and azide insensitive mitochondrial pathway in *Ustilago maydis*. *Biochimica et biophysica Acta*. 592:223-234.

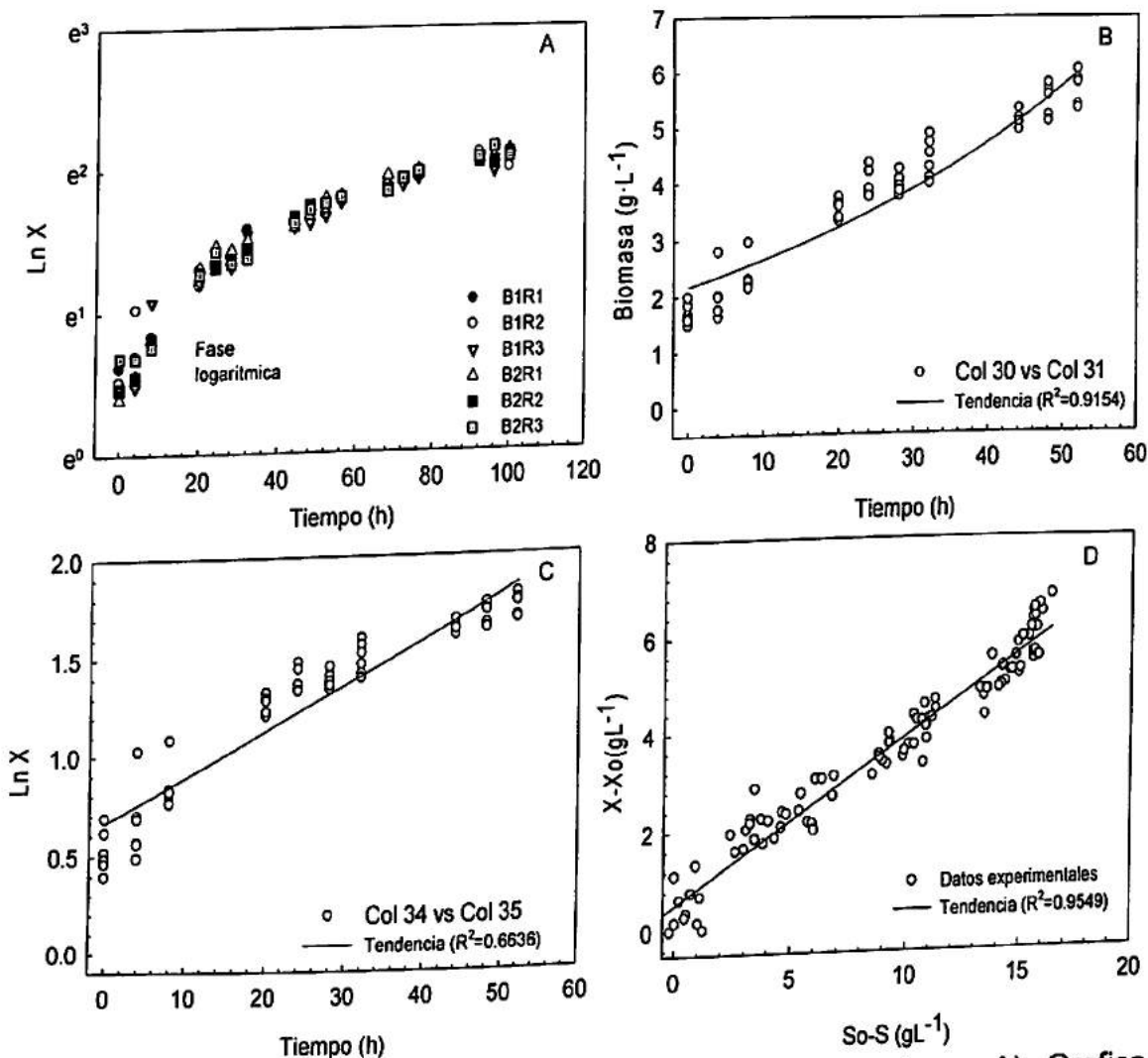
7. ANEXOS



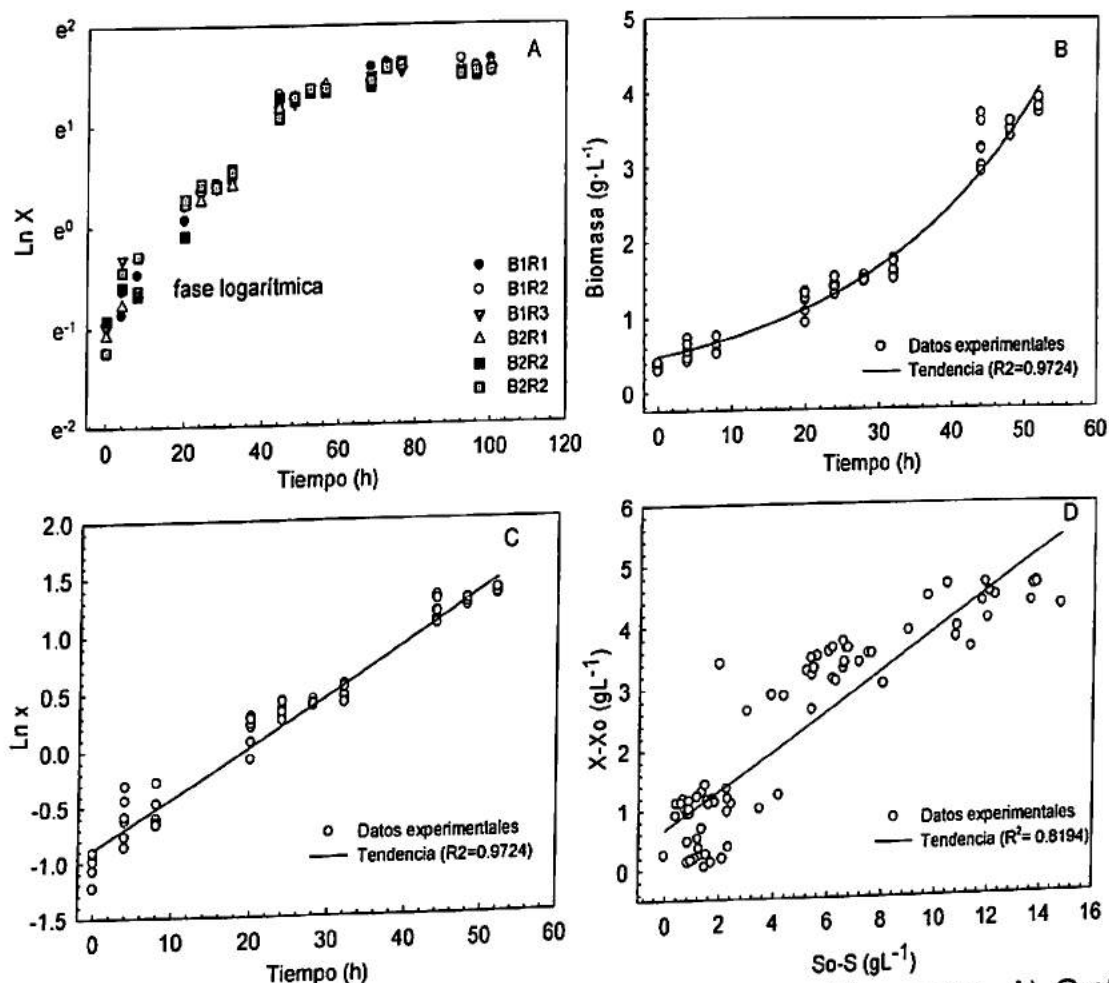
Anexo 1. Datos del medio de cultivo YPD, en matraces agitados. A) Grafica semilogaritmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logaritmica para estimar $\mu_{\max}$. C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logaritmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar $Y_{s/x}$.



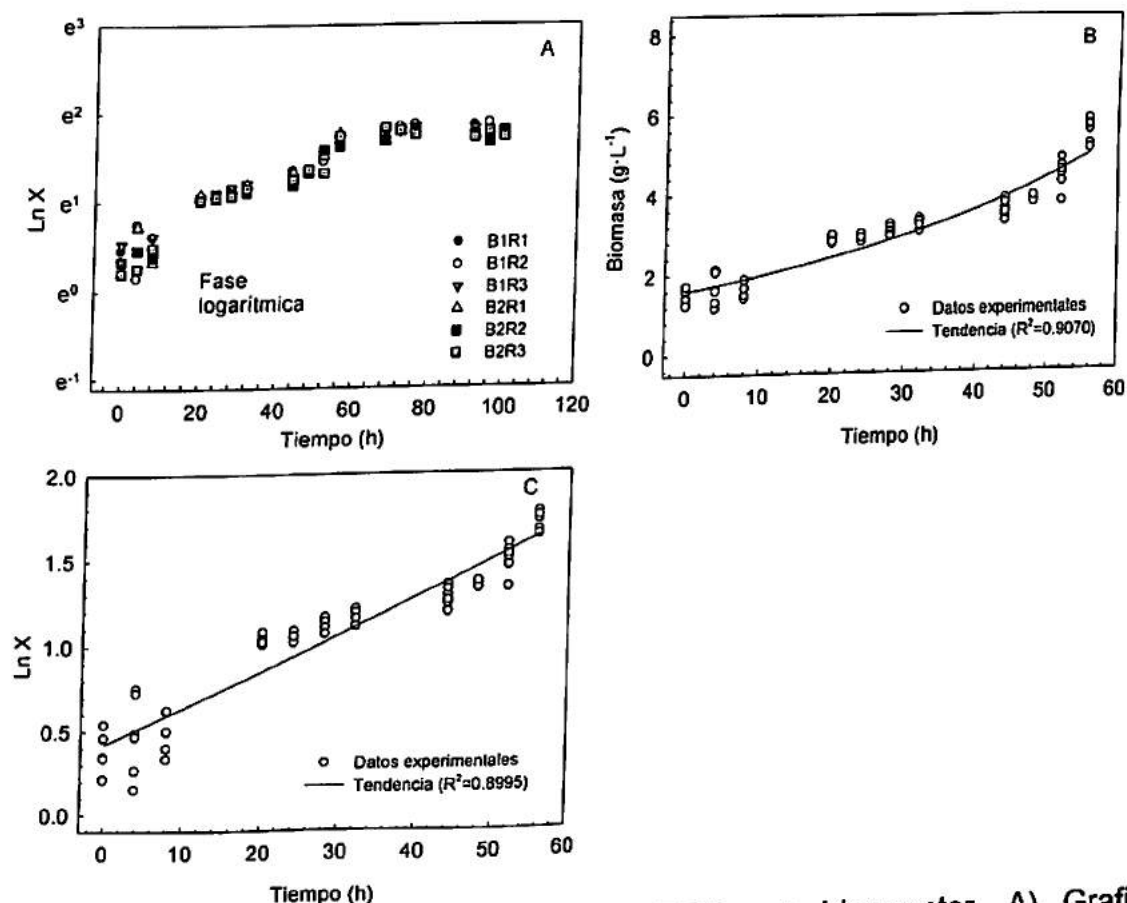
Anexo 2. Datos del medio de cultivo PDB, en matraces agitados. A) Grafica semilogaritmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logaritmica para estimar μ_{max} . C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logaritmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar $Y_{s/x}$.



Anexo 3. Datos del medio de cultivo YPD, en biorreactor. A) Grafica semilogaritmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logaritmica para estimar $\mu_{\max}$. C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logaritmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar $Y_{s/x}$.



Anexo 4. Datos del medio de cultivo Grimm-Allen, en biorreactor. A) Grafica semilogarítmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logarítmica para estimar μ_{max} . C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logarítmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar $Y_{s/x}$.



Anexo 5. Datos del medio de cultivo PDB, en biorreactor. A) Gráfica semilogarítmica de datos experimentales. B) Datos experimentales en fase logarítmica para estimar μ_{max} . C) Representación lineal de $\ln X$ vs tiempo de la fase logarítmica. D) Representación de las diferencias de X y S para determinar $Y_{s/x}$.