



Original
Artículo español

Inducción de infección en Teosinte (*Zea diploperennis*) con el fitopatógeno *Ustilago maydis*.

Induction of infection in Teosinte (*Zea diploperennis*) through the phytopathogen *Ustilago maydis*.

Martha Concepción Pérez Díaz¹, Marco Antonio Sánchez Medina¹, María del Socorro Pina Canseco², Eduardo Pérez Campos¹, Iván Antonio García-Montalvo¹, Alma Dolores Pérez Santiago¹

¹Unidad de Bioquímica e Inmunología, Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

²Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca, México.

Resumen

Introducción: El maíz y teosinte comparten similitudes morfológicas y moleculares siendo estas últimas las que sustentan la teoría del teosinte (*Zea parviglumis*) como su antecesor, ambas especies son atacadas por fitopatógenos específicos, como *Ustilago maydis*.

Objetivo: Analizar el proceso infeccioso que presenta *U. maydis* sobre el teosinte variedad *Zea diploperennis*.

Materiales y Métodos: Se utilizó la cepa de *U. maydis* FB-D12, la cual se mantuvo en medio de cultivo rico en nutrientes (CPES) pH 7.0. Se emplearon células viables y sin alteraciones morfológicas para la inoculación por el método de punción en las plántulas de teosinte. El seguimiento de la infección se realizó cada 24 horas midiendo concentración de clorofila y observación microscópica del tejido vegetal.

Resultados: En las plántulas de *Zea diploperennis* inoculadas con *U. maydis* se presentaron los síntomas de la infección, marchitamiento y clorosis en las hojas; esto se confirmó con la baja concentración de clorofila 12 días posteriores a la inoculación. En la observación microscópica de cortes del tejido vegetal se encontró micelio largo y ramificado a partir del tercer día de la inoculación, hasta la aparición de tumores en plántulas de 45 días.

Conclusiones: Los signos característicos de la infección con *Ustilago maydis* en la variedad de teosinte *Zea diploperennis* no difieren de los reportados para el maíz. *U. maydis* presenta su ciclo de vida completo dentro de la planta confirmando que la variedad *diploperennis* es susceptible.

Palabras clave

Ustilago maydis; teosinte; *Zea diploperennis*; infección; huitlacoche

Abstract

Introduction: The corn and teosinte share morphological and molecular similarities latter being those that support the theory of teosinte (*Zea parviglumis*) as its predecessor, both species are attacked by specific pathogens like *Ustilago maydis*.

Objective: To analyze the infectious process that presents *U. maydis* on the variety of the teosinte *Zea diploperennis*.

Materials and Methods: We used the strain of *U. maydis* FB-D12, which was kept a culture media rich in nutrients (CPES) pH 7.0. Viable cells without morphological alterations to the inoculation method of puncture in teosinte seedlings were used. Monitoring of infection was carried out every 24 hours by measuring concentration of chlorophyll and plant tissue through microscopic observation

Results: In the seedlings of *Zea diploperennis* inoculated with *U. maydis* the symptoms of the infection were presented, wilt and chlorosis in the leaves; The chlorosis was confirmed with the low concentration of chlorophyll 12 days later to the inoculation. In the microscopic observation of cuts of the tissue plant was found mycelium long and branched from the third day of the inoculation, until the appearance of tumors in seedlings of 45 days.

Conclusions: The typical signs of infection with *Ustilago maydis* in the variety of teosinte *Zea diploperennis* do not differ from those reported for corn. *Ustilago maydis* presents its full life cycle within the plant, confirming that the *diploperennis* variety is susceptible.

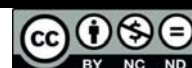
KEYWORDS

Ustilago maydis; teosinte; *Zea diploperennis*; infection; huitlacoche

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aperez_santiago@hotmail.com (Alma Dolores Pérez Santiago).

Recibido el 10 de octubre de 2016; aceptado el 28 de octubre de 2016.



Introducción:

Después de muchos años de estudios la hipótesis del teosinte como el antepasado silvestre del maíz ha sido ampliamente apoyada, aceptando su influencia en la alta variabilidad genética y desarrollo de las principales razas de maíz en Mesoamérica (Doebley 1990, Matsuoka *et al*, 2002). Con los datos genéticos disponibles se ha confirmado que la especie de teosinte *Z. mays ssp. parviglumis* es el antepasado directo del maíz más cercano (Kato, 1998; Aragón, 2006), mientras que *Zea diploperennis* resulta ser de las especies más prometedoras para usarse en el mejoramiento genético de maíz en áreas subtropicales, de acuerdo a los datos reportados por García *et al*, 2002, quien estimó el efecto de seis fuentes de teosinte en varias generaciones de recombinación de variedades sintéticas de maíz. Sin embargo, algunas especies de teosinte son muy distintas genética y taxonómicamente a las del maíz, y no parecen haber desempeñado ningún papel en el origen del mismo.

Los teosintes son plantas rústicas y silvestres que aún se encuentran en varias localidades de México, en muchas ocasiones se les considera como malas hierbas o maleza, y en otras son una fuente alterna de alimento para el ganado cuando escasea el forraje. Los teosintes (*Zea spp*) son gramíneas que engloban distintas especies: *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis*; y varias subespecies de *Zea mays*: *ssp. huehuetenangensis*, *ssp. mexicana* y *ssp. parviglumis* (Matsuoka *et al*, 2002).

Por otra parte, *Ustilago maydis* es el causante de la enfermedad del maíz conocida como “carbón del maíz”, su consumo como alimento humano proviene desde la época prehispánica, los aztecas lo llamaban “cuitlacoचित्ति” (suciedad, basura o excremento) y cochtli (dormido) (López, 1988). Es un hongo que presenta tres formas durante su ciclo de vida, a) una forma unicelular (esporidia) que es haploide uninucleada y presenta crecimiento saprofito; b) una forma filamentosa dicariótica, la cual es parasítica y patogénica; y c) una forma diploide (teliospora), la cual solamente es formada en los tumores de la planta hospedera (Christensen, 1963; Banuett, 1995).

U. maydis puede atacar a su huésped en cualquier estadio de crecimiento, produciendo síntomas que incluyen el desarrollo de tumores en mazorcas, espigas, hojas y tallos, los cuales dan como resultado alteraciones en la morfología de la planta y reducción del crecimiento y la producción de grano (Estrada *et al*, 2010). Debido a la importancia económica que el hongo ha adquirido y al desarrollo de técnicas para la inducción artificial de este, es importante estudiar la relación entre el patógeno y las variedades de hospedante. Se ha evaluado la severidad, incidencia y rendimiento del hongo por planta en diferentes variedades de maíces híbridos (Martínez, 2005; Valdez *et al*, 2009; Aguayo, 2016; Luna, 2015), encontrándose diferencias en la susceptibilidad a la infección, por ejemplo, el maíz dulce tiene un alto grado de sensibilidad (Valverde, 1993; Venegas, 1995). La resistencia a este hongo en diferentes variedades de maíz está asociada a caracteres morfológicos, fisiológicos y funcionales (Guevara-Lara *et al*, 2000). El maíz y teosinte comparten grandes similitudes morfológicas y moleculares siendo estas últimas las que sustentan la teoría del teosinte como antecesor del maíz; entre otras semejanzas se puede citar que ambas especies son atacadas por fitopatógenos específicos, como *Ustilago maydis*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el proceso de infección en teosinte *Zea diploperennis* por *Ustilago maydis*, induciendo la infección y controlando parámetros de crecimiento. Según expertos, el teosinte contiene valioso material que puede mejorar y revigorizar genéticamente los actuales cultivos de maíz, ya que tolera la humedad, los fuertes vientos y las malezas; habita en las tierras altas con presencia de heladas esporádicas, y puede ser hibridado libremente en estado silvestre.

Materiales y Métodos:

Obtención de plántulas de teosinte

Se utilizaron semillas de la variedad *Zea diploperennis* recolectadas en el rancho “Texas” ubicado en el distrito de Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México; las cuales fueron sembradas en charolas de plástico de 15 x 60 cm, en donde se humedecieron cada 24 h manteniéndose a temperatura ambiente (27 ± 3 °C) durante 30 días.

Inducción de infección

Para inducir la infección en coleoptilos de teosinte se emplearon levaduras de *Ustilago maydis* de la cepa diploide denominada FB-D12, donada por el Dr. Carlos Leal Morales (Universidad de Guanajuato, Gto., México). Se utilizaron células viables y sin alteraciones morfológicas obtenidas de resiembras en medio de cultivo Caldo Papa Elote Sacarosa (CPES) pH 7.0, con incubación a 26 °C y 65 rpm (LAB LINE). Se empleó una suspensión de 2×10^6 cél/ml, mediante conteo en cámara de Neubauer. La inoculación se realizó por punción en la base de cada plántula con ayuda de una jeringa para insulina con aguja número 27Gx1/2”.

Análisis de la infección en plántulas de teosinte (*Zea diploperennis*)

A partir de las 24 horas posteriores a la inoculación se inició el análisis de las plántulas de teosinte, éste incluyó la observación microscópica para localizar levaduras en el tejido y zonas cercanas al punto de inoculación, cuantificación de clorofila, y la observación de tumores presentes en las mazorquillas, característicos de la infección. Las muestras de tejido de las plántulas se obtuvieron por cortes con bisturí, tanto de hojas como de zonas cercanas al sitio de punción. Éstos fueron extendidos sobre portaobjetos agregando rosa de bengala al 0.05%, se dejó actuar el colorante durante 4 minutos y se realizó la observación en microscopía de contraste de fases (Carl Zeiss Jen EmbH D-07740).

Para el análisis de clorofila, se preparó un extracto con 1 g de la plántula de teosinte macerada con 10 ml de acetona. La mezcla se filtró al vacío y se realizaron 2 extracciones más con 5 ml de acetona. El volumen total de extracto

obtenido se aforó a 25 ml con acetona, y se midió absorbancia en un espectrofotómetro (SPECTRONIC 20D, Milton Roy Company) a una longitud de onda de 645 y 663 nm. Para la determinación cuantitativa de la clorofila contenida en el extracto, expresada como mg de clorofila por gramo de tejido extraído, se ocupó la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila total} = 20.2(\text{absorbancia } 645\text{nm}) + 8.02(\text{absorbancia } 663\text{nm})(25\text{ml}/100 * 0.25\text{g})$$

Resultados:

La germinación de las semillas se hizo visible entre los días cuatro y cinco después de la siembra, observándose el coleoptilo y sus primeras hojas aún enrolladas. La cepa de *Ustilago maydis* se mantuvo en condiciones óptimas para ser inoculada, según se muestra en la figura 1, con su morfología típica, tamaño y proliferación suficiente para alcanzar el número de células requeridas para la infección.

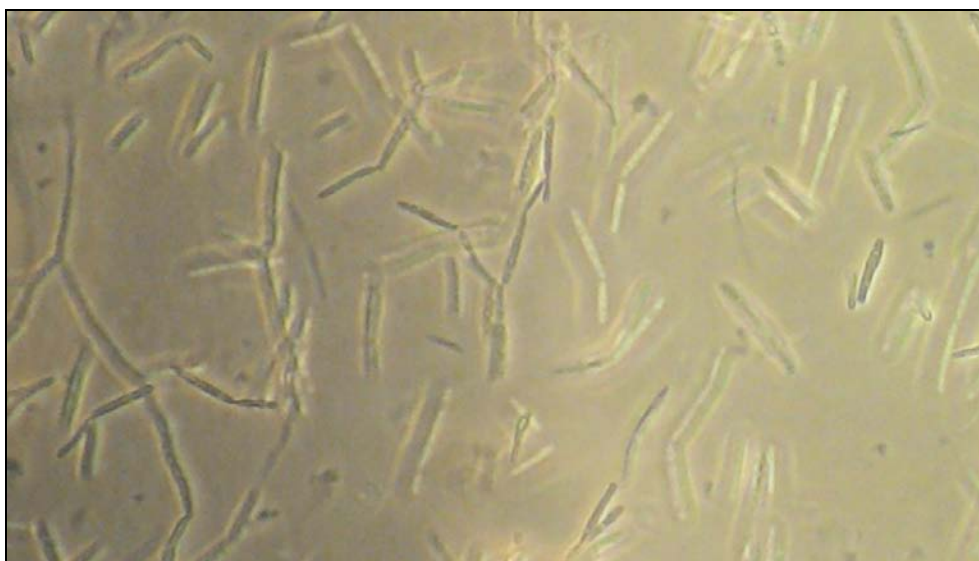


Figura 1. Levaduras de *Ustilago maydis* (cepa FBD12), observadas en un objetivo de 40X (Carl Zeiss Jen EmbH D-07740).

Cuando la infección se presentó en las plántulas inoculadas se observó marchitamiento y clorosis en las hojas a partir del día 3 después de la inoculación. Se midió la clorofila en éstas plantas como indicativo de infección, así como en plantas sanas usadas como control, observando que no hubo diferencias entre la planta sana y la infectada durante los primeros 10 días; en la planta infectada disminuyó la concentración de clorofila después del día 12, la cual se mantuvo baja hasta después de los 20 días (figura 2).

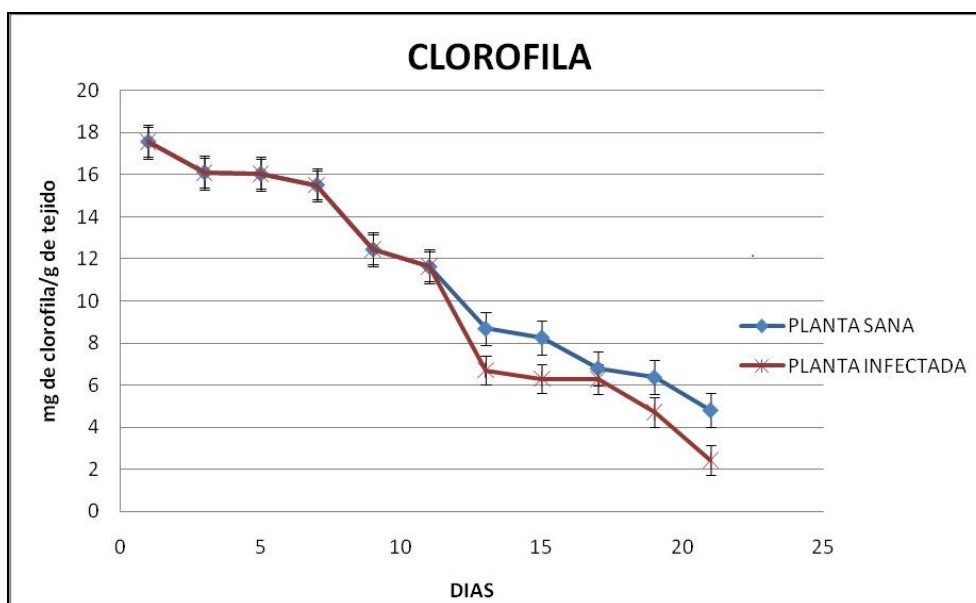


Figura 2. Concentración de clorofila en plantas sanas vs inoculadas con *Ustilago maydis* (cepa FB-D12).

La evidencia mas convincente de la infección en las plántulas fue obtenida a través de microscopía, observando tejidos cercanos al punto de inoculación y hojas. A las 24 horas posteriores a la inoculación, se observó un gran número de levaduras en la zona cercana a la punción (figura 3), y en hojas (figura 3a); a partir del tercer día se encontró micelio largo y ramificado en las muestras (figura 3b, 3c).

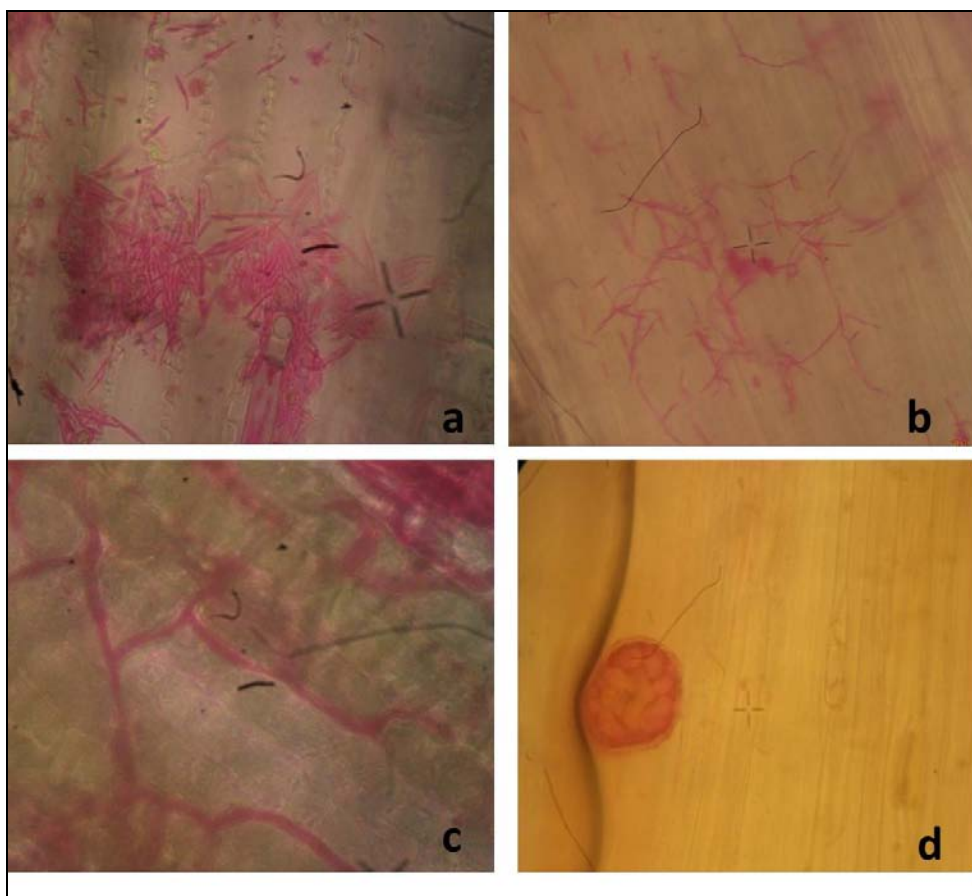


Figura 3. Observación microscópica de tejido de teosinte infectado. a) Levaduras de *Ustilago maydis* en el objetivo de 45X; b) Formación de micelio observado en el objetivo de 10X; c) 45X; d) Una espora del fitopatógeno en el objetivo 45X .

Confirmada la infección en las plántulas de teosinte, éstas fueron pasadas a tierra donde continuaron su crecimiento durante 30 días más, y finalmente pudieron observarse esporas (figura 3d). Las tumoraciones características de *U. maydis* se presentaron en algunas mazorquillas del teosinte, similares a las que aparecen cuando este patógeno infecta al maíz de manera silvestre (figura 4).



Figura 4. Tumoraciones producidas en teosinte (*Zea diploperennis*) a través de la infección con *U. maydis* (cepa FB-D12).

Discusión:

El fitopatógeno *U. maydis* es un basidiomiceto conocido por causar la enfermedad llamada carbón común en maíz, esta infección propicia la formación de grandes tumores o agallas que al desarrollarse en la mazorca se conocen como “huitlacoche o cuiltacoche”, usadas en México para la preparación de diferentes platillos gastronómicos regionales (Méndez Moran y Luis Herrera, 2008). La interacción *U. maydis*-maíz ha llegado a ser uno de los modelos más importantes e interesantes usado para el estudio de aspectos fundamentales en biología, ya que este hongo es muy fácil

de cultivar e investigar en el laboratorio o invernadero, así como por presentar propiedades genéticas que lo hacen un importante candidato para explicar el mecanismo molecular de los hongos fitopatógenos y el sistema de defensa de diversos hospederos (Basse and Steinberg 2004; Bolker 2001).

El establecer un método de infección con este fitopatógeno en teosinte sienta las bases para posteriores estudios que permitan entender la relación que guarda el maíz con sus parientes biológicos más cercanos. *Ustilago maydis* presenta un ciclo de vida complejo, sin embargo, la infección inducida en *Zea diploperennis* por la metodología propuesta en este trabajo permitió observar por microscopía las fases del hongo dentro de la planta. Las levaduras de la cepa diploide FB-D12 que fueron inoculadas dieron lugar a la formación de filamentos delgados, micelio dicariótico en una amplia zona de la planta, protuberancias que se transformaron en teliosporas esféricas o elipsoidales, y finalmente la formación de agallas. Los tumores se presentaron principalmente en los granos, con agallas del tamaño de la mazorquilla completa, cubiertas por una membrana blanca encerrando a las células hipertrofiadas del hospedero así como al micelio del hongo. Durante la maduración la membrana se tornó de color grisáceo, y posteriormente las teliosporas fueron liberadas al ambiente al romperse la membrana de la agalla. Todo el proceso de infección observado en *Zea diploperennis* fue similar al reportado (Agrios, 2006; Christensen, 1963; De la Garza, 1974) para maíz, lo que confirma la susceptibilidad de la variedad de teosinte evaluada.

Conclusión:

Los signos característicos de la infección con *Ustilago maydis* en la variedad de teosinte *Zea diploperennis* no difieren de los reportados para el maíz. *U. maydis* presenta su ciclo de vida completo dentro de la planta confirmando que la variedad *diploperennis* es susceptible. Aunque *Zea diploperennis* no es una variedad tan cercana filogenéticamente como lo es *Zea parviglumis*, el reconocimiento con el fitopatógeno se presenta igual que en el maíz.

Se propone inducir la infección del fitopatógeno en otras variedades de teosinte para evaluar posibles diferencias en la susceptibilidad, tal como se ha encontrado en variedades híbridas de maíz.

Conflicto de interés:

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente manuscrito.

Referencias

1. Agrios, G. N. (2006). Fitopatología 2° ed. Ed. LIMUSA, México, D.F
2. Aguayo G. J.; García M. A. (2016). Tesis para obtener grado de Maestría. "Producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en el estado de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Agropecuarias
3. Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annu. Rev. Genetics 29
4. Basse, CW and Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis* model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. Molecular plant pathology 5(2): 83 - 92
5. Chávez-Tovar V. H.; Bedoya C. (2010). Teocintle: El ancestro del maíz. Claridades Agropecuarias No. 201. Pag. 32-42
6. Bolker, M (2001) *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. Microbiology 147: 1395-1401
7. Christensen, J. J. (1963) Corn smut caused by *Ustilago maydis* Cda. The American Phytopathological Society. Department of Plant Pathology and Botany. Institute of Agriculture, University of Minnesota, St. Paul. 41p.
8. Doebley, J. (2004). Molecular evidence and the evolution of maize. Econ. Bot. 44: 6-27.
9. Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. Rev. Genet, 20014. 38: 37-59 doi; 10.1146/annurev.genet.38.072902.092425
10. Estrada L. A.; López C. A.; Ramos A. H. E; Guerrero, A. A., Ruiz, H. J. (2010). Identificación de las proteínas secretadas por el hongo *Ustilago maydis*. Cultivado en condiciones in vitro. Nova Scientia, 2, (4): 104-130
11. Guevara-Lara, F., Valverde, M.E. and Paredes-López, O. (2000). Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (huitlacoche) strains on maize related to in vitro production of 49 indole-3-acetic acid. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16:481-490
12. Kahmann, R. (2002) Fungus drains resistance. Max Plant Research, 4: 32-39
13. Klosterman, S.J. (2007). Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. Advances in Genetics 57, 1-24.
14. Luna, C.G. (2015). Tesis de Licenciatura. Estudio de la infectividad de huitlacoche (*Ustilago maydis* corda 1842) en dos variedades de maíces criollos de Oaxaca. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
15. López A., G.F. (1988). Factores que determinan el desarrollo de *Ustilago maydis* (D. C.) Cda; agente causal del huitlacoche del maíz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Fitopatología. Montecillos, México
16. Martínez E. A., Ruiz Herrera J. (2000). Las vías de transducción de señales en la patogénesis y la morfogénesis de hongos: Los casos de *U. maydis* y *Magnaporthe grisea*. Revista Mexicana de Fitopatología, 18, 54-60

17. Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman M, Sanchez J, Buckler E and Doebley J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6080-6084
18. Méndez M.; Herrera L. (2008). Estudio de genes diferenciales durante el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* un huésped no natural. Avance en la investigación científica en el CUCBA. EN XIX Semana Nacional de Investigación Científica. Zapopan, Jalisco, México. p 407
19. Sánchez G. J.; Kato Y. *et al*, (1998) Distribución y caracterización del teocintle. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Sagar. Libro Técnico Núm. 2
20. Trezzi, C. R. (2000). Sobrevivencia de stenocarpella *U. maydis* E stenocarpella macrospora em Restos Culturales de Milho. Brasil: Vicoso Minas Gerai.
21. Valdez, M. M.; Valverde M. E. y Paredes L. O. (2009) Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV – Irapuato. Sinnco pp. 10-37.
22. Valverde, M. E.; Paredes L. O. (1993). Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.). *Food Biotechnology* 7 (3): 207–219.
23. Venegas P. E (1995). Procedimientos tecnológicos para la producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) efecto de la cepa y materiales genéticos de maíz sobre la calidad. Tesis maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato.