



Nova Scientia

E-ISSN: 2007-0705

nova_scientia@delasalle.edu.mx

Universidad De La Salle Bajío

México

Ruiz Herrera, José

Ustilago maydis: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico

Nova Scientia, vol. 1, núm. 1, noviembre-abril, 2008, pp. 118-135

Universidad De La Salle Bajío

León, Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203315665007>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

 **redalyc.org**

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Ruiz, J.



Revista Electrónica Nova Scientia

Ustilago maydis: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico

José Ruiz Herrera

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Gto. México

Artículo por invitación

México

Departamento de Ingeniería Genética
Unidad Irapuato
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León
36821, Irapuato, Gto. México
Tel. 462 6239652. Fax 462 62 45849
Correo electrónico: jruiz@ira.cinvestav.mx

Resumen

En el presente trabajo se describe la naturaleza del hongo *Ustilago maydis*, su papel como causante de una enfermedad del maíz, su uso en la cocina mexicana y las condiciones que lo llevaron a convertirse en material de estudio científico, además de algunas características descollantes de su fisiología, genética y bioquímica. *U. maydis* es un hongo patógeno biotrófico específico del maíz, y el teozintle, siendo el agente causal del “huitlacoche” o carbón común, una enfermedad de distribución mundial que bajo ciertas condiciones puede causar severos daños económicos. Sin embargo, en México, las mazorcas infectadas han sido un alimento usado en la cocina tradicional desde la época pre-colombina, y actualmente también en la alta gastronomía del país y el extranjero. El hongo y sus huéspedes son nativos de la parte central de México, y fueron introducidos en Europa por los españoles, donde la enfermedad fue considerada como una alteración fisiológica de la planta. Su naturaleza como infección fúngica fue reconocida solo hasta la segunda mitad del siglo XIX. *U. maydis* se introdujo a los laboratorios de investigación a principios del Siglo XX, convirtiéndose en un modelo clásico para el estudio de las bases de la patogénesis fúngica en plantas, de la especificidad en el apareamiento y de la recombinación genética, entre otras. Esto fue debido a su facilidad de manejo, su corto ciclo de vida, y el ser posible su análisis mediante métodos de genética clásica y molecular. El ciclo de vida del hongo es complicado alternando formas de levadura haploide saprofítica y micelio dicariótico infeccioso. Este ciclo sexual solo se completa en su huésped natural, estando bajo el control de dos *loci* de apareamiento que controlan la fusión celular y la patogénesis. En condiciones de cultivo axénico, hemos demostrado que el hongo es capaz de infectar plantas filogenéticamente distantes del maíz; y hemos desarrollado condiciones para completar su ciclo de vida mediante la interacción del patógeno con callos de maíz separados por una membrana que evita su contacto físico. Por medio del control de pH del medio de cultivo, hemos logrado la transición de levadura a micelio *in vitro*. Otro aspecto importante es la naturaleza de las vías de transducción de las señales que regulan el comportamiento sexual, la morfogénesis y la patogénesis de *U. maydis*. Se ha demostrado que éstas involucran vías MAPK y PKA que operan antagónicamente en la morfogénesis y en forma cooperativa en la patogénesis. No cabe duda que en el futuro, *U. maydis* seguirá siendo útil para desvelar los secretos de la patogénesis de los hongos en las plantas y deleitar a los amantes de la buena cocina.

Palabras clave: *Ustilago maydis*, patogénesis, transducción de señales, ciclo sexual

Recepción: 19-09-08

Aceptación: 16-10-08

Summary

In this review I describe the properties of the fungus *Ustilago maydis*, its role as the causal agent of a maize disease, its use in the mexican cuisine, and the conditions that led it to become a subject of scientific research, besides some salient features of its physiology, genetics and biochemistry. *U. maydis* is a biotrophic pathogen specific for maize and teozintle, plants where it causes the disease known as “huitlacoche” or common smut, a disease world-wide distributed, that under certain conditions may cause important economic losses. However, in México, the diseased fresh ears have been used in the preparation of traditional dishes since the pre-hispanic period, recently reaching the modern cuisine. Both, *U maydis* and its host are native of the central part of México, and were introduced in Europe by the Spaniards, where the disease was originally considered to be due to an alteration in the physiology of the plant. Its infectious nature was recognized only in the second half of the XIX Century. *U. maydis* was introduced into research laboratories at the beginning of the XX Century, becoming a classic model for the study of the bases of fungal pathogenicity in plants, of mating specificity, and genetic recombination, among others. This was due to the facility in the handling of *U. maydis*, its short life cycle, and the possibility to apply methods of classical and molecular genetics. The life cycle of *U. maydis* is complex with the alternation of haploid saprophytic yeasts and infectious dikaryotic mycelium. The life cycle is completed only in its natural host, and is under the control of two *loci* that control mating and pathogenesis. Using axenic conditions we found that *U. maydis* can infect other plants phylogenetically distant to maize. We have developed conditions for the completion of the life cycle *in vitro* through the interaction of the pathogen with maize calli separated by a semi-permeable membrane that precludes their direct physical contact. Also, by means of the control of pH of the culture media, we have obtained the transition of the fungus from the yeast

form to mycelium *in vitro*. Another important aspect is the nature of the transduction pathways that relay the signals that regulate the sexual behavior, morphogenesis, and pathogenesis of *U. maydis*. It has been demonstrated that these involve MAPK and PKA systems that operate antagonically in morphogenesis, and synergically in pathogenesis. No doubt that in the future *U. maydis* will keep being useful in revealing the secrets of the mechanisms involved in fungal pathogenesis in plants, and in providing pleasure to the lovers of the gourmet cuisine.

Key words: *Ustilago maydis*, pathogenesis, signal transduction, sexual cycle

Introducción

El huitlacoche (carbón común) es una enfermedad específica del maíz (*Zea mays*) y de su probable antecesor, el teozintle (*Zea mays ssp parviglumis*; del náhuatl teocintli, “grano de los dioses”, nombre aplicado a diversas especies del género *Zea* nativos de Mesoamérica), la cual se caracteriza principalmente por el desarrollo de tumores o agallas en las mazorcas.

Se sabe que el maíz se domesticó en la parte central de México. Aunque las fechas de este proceso son aún discutibles, lo más probable es que el proceso se inició hace *ca.* 9000 años, según datos obtenidos de material recogido en la cuenca del río Balsas. Las muestras más antiguas de maíz (de hace 6250 años) han sido encontradas en la cueva Guila Naquitz del Valle de Oaxaca. Pero el proceso debió haber sido lento hasta poder obtener variedades autóctonas semejantes a las actuales.

La enfermedad del huitlacoche es causada por un hongo, *Ustilago maydis*. *U. maydis* es un basidiomiceto del grupo de los Ustilaginales. Los Ustilaginales constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 1200 especies, que infectan a más de 4000 plantas monocotiledóneas divididas en 75 familias en todo el mundo. Estos patógenos poseen el potencial de causar severas epifitias e importantes pérdidas económicas a la agricultura, aún con el uso de tratamientos químicos a las semillas y a las plantas, la existencia de cultivares parcialmente resistentes y los diferentes métodos de cultivo empleados. Entre las especies de Ustilaginales fitopatógenos podemos citar a *Ustilago hordei* (carbón cubierto) y *U. nuda* (carbón volador), que parasitan a la cebada, y a *U. nigra* (carbón volador negro) de la avena. Entre los patógenos del trigo se puede citar a *Tilletia indica* (carbón parcial), *T. caries* y *T. controversa* (carbones hediondo y causantes de enanismo). *T. scitaminea* es un importante parásito de la caña de azúcar.

Dada la especificidad de huésped de *U. maydis*, es de presumirse que el hongo es un parásito que evolucionó a partir de un antecesor común con otros *Ustilago spp* hasta adquirir la categoría de especie diferente, al convertirse en un patógeno específico del teozintle y el maíz. Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada al analizar la variabilidad del virus de *U. maydis* (UMV-H1) en muestras de huitlacoche obtenidas de diferentes localidades de México, Estados Unidos y Sudamérica. Los resultados demostraron que el virus acompañó al patógeno durante la

introducción del maíz proveniente de nuestro país en Norte y Sudamérica, fenómeno que ocurrió en varias ocasiones durante el periodo pre-hispánico.

Interesantemente, el huitlacoche en nuestro país, no es generalmente una plaga, sino que normalmente infecta a lo más entre 1 y 5 % de las plantas de un cultivo. Y aún más, constituye una ganancia para el agricultor, ya que una mazorca infectada tiene un valor de mercado varias veces más alto que el de una sana. La razón de ello es que, como bien sabemos, el huitlacoche es comestible y constituye la base de una serie de platillos típicos de México, muchos de los cuales se remontan a la época pre-colombina, aunque fuesen desdeñados por los conquistadores de nuestro país. Sin embargo, más recientemente, el gusto por su sabor tan peculiar que le ha valido el nombre de “trufa americana” le ha abierto las puertas de la alta gastronomía en el país y en el extranjero, donde llega a alcanzar precios exorbitantes.

Una pregunta a hacerse es ¿cómo *U. maydis*, un hongo mexicano que constituye una aportación de la gastronomía náhuatl al mundo, llegó a convertirse en un importante modelo de estudio biológico en laboratorios científicos destacados del país, de Estados Unidos y de Europa? Para ello debemos partir de dos aspectos: 1) ¿Cuál ha sido el tortuoso camino que siguió este parásito, aparentemente sin un severo impacto en la agricultura, desde las cocinas mexicanas hasta llegar al mundo científico?; y 2) ¿Qué características posee que lo han hecho atractivo para la Ciencia? A continuación describiré brevemente algunos aspectos relevantes relacionados con ambos aspectos, y algunos datos de la fisiología, bioquímica, genética y patogénesis de *U. maydis*.

Se sabe que el huitlacoche fue introducido en Europa por los españoles (probablemente en forma accidental con maíz infectado), pero durante siglos se pensó que la enfermedad era debida a una alteración fisiológica de la planta. No fue sino hasta 1836 que Unger identificó al huitlacoche como la infección por un hongo al que llamó *Ustilago zaeae*; y en 1883-1895 Breffeld logró la infección experimental del maíz con esporas del hongo; pero no fue sino hasta 1927 que se conoció su ciclo de vida al descubrirse su estado sexual. Su nombre fue oficialmente cambiado a *U. maydis* (De Candolle, Corda) por Stevenson y Johnson en los Estados Unidos (citado por Christensen 1963).

Posiblemente los estudios iniciales más serios sobre el ciclo de vida y la fisiología de *U. maydis* fueron los realizados por Christensen y Stakman en los años 1930-1950, mismos que fueron recogidos en una importante monografía por Christensen (1963). Pero es quizás el terreno de la genética donde *U. maydis* aportó sus más importante contribuciones iniciales como modelo ideal para la comprensión de las bases moleculares de esta ciencia. Se ha dicho que quien realizó los primeros estudios serios sobre la genética de *U. maydis* fue David Perkins, quien siendo estudiante de la Universidad de Columbia en Nueva Cork, un día de los años 40 del siglo pasado, en que recorría la propiedad Rockefeller, pasó por un sembrado de maíz, y le llamó la atención una mazorca infectada con *U. maydis*. La recogió y la llevó a su laboratorio, donde realizó un interesante estudio genético, que involucró el primer aislamiento de mutantes bioquímicas del hongo (Perkins 1949). Sin embargo, fue Robin Holliday quien en Inglaterra y desde la mitad del siglo pasado, realizó los estudios más profundos de la genética de *U. maydis*, estableció los modelos de recombinación genética aceptados actualmente y sentó las bases para convertir a este hongo en un modelo para el estudio de aspectos biológicos básicos (ver Holliday 1961, 1974). Actualmente se considera que *U. maydis* es el modelo fúngico más estudiado para el análisis de la patogénesis en plantas.

Las características que han hecho de *U. maydis* un modelo atractivo para el estudio genético molecular se pueden resumir de la siguiente manera: la existencia de una fase haploide, en la cual el hongo forma colonias compactas, que permiten el uso de técnicas microbiológicas comunes (esta propiedad fue elogiada por Holliday quien señaló que fue la base para sus estudios genéticos iniciales al poder emplear la técnica de réplica con terciopelo para la identificación de mutantes); la posibilidad de construir diploides en el laboratorio, lo cual hace posible el llevar a cabo exámenes de dominancia y complementación; la transformación con DNA exógeno; su susceptibilidad a que un segmento genómico sea remplazado con una copia mutada del gen por recombinación homóloga; la existencia de múltiples marcadores de selección para la manipulación genética: la existencia de meiosis lo cual facilita llevar a cabo análisis de segregación; la capacidad para completar su ciclo de vida en plantas de maíz jóvenes de tres semanas de edad o menos; la posibilidad de analizar la transición dimórfica (levadura a micelio) *in vitro* y el hecho de que su genomio haya sido totalmente secuenciado y sea accesible (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>).

El ciclo de vida de *U. maydis* en la naturaleza y la patogénesis

U. maydis no es un parásito obligado, pero requiere de uno de sus dos huéspedes naturales para realizar su ciclo sexual. Solamente los dicariones y los diploides son infecciosos, lo que muestra la interrelación entre los aspectos de sexualidad, morfogénesis y patogénesis, y revela la complejidad de los tres procesos. El ciclo de vida del hongo se muestra en la Fig. 1 (ver Banuett 1992, Holliday 1974, Ruiz-Herrera *et al.* 2000). Durante el ciclo de vida de *U. maydis* se distinguen dos fases. Una de ellas es saprofítica, durante la cual el hongo crece en forma de levaduras haploides alargadas que se reproducen por gemación (también llamadas esporidias). La gema aparece en la zona de máxima curvatura formando un ángulo de 30-45° grados con respecto a la célula madre. La gemación bipolar es común en contraste con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *U. maydis* no es un colonizador eficiente de nichos naturales, ya que el rango de las fuentes de carbono que puede utilizar es muy restringido (Caltrider y Gottlieb, 1965).

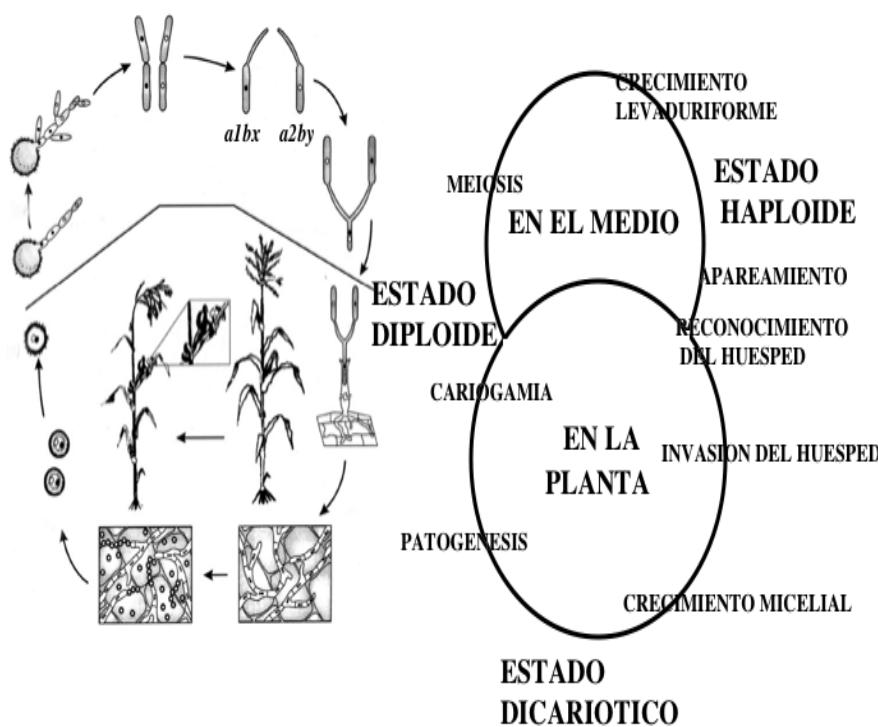


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Izquierda; se muestra la germinación de las teliosporas con la formación del promicelio y las cuatro basidiosporas. Éstas se desprenden y se multiplican en la forma de levadura. A continuación se representa la conjugación de dos esporidias sexualmente compatibles para formar el dicarión que invade la planta y se multiplica en forma micelial, dando lugar a los tumores donde se forman las teliosporas. Éstas germinan fuera de la planta para reiniciar el ciclo. Derecha; se indican los tres estadios del hongo: haploide, dicariótico y diploide, el sitio donde proliferan, y la secuencia de eventos por los cuales avanza el ciclo de vida del hongo.

La segunda fase es la micelial y patogénica, durante la cual el hongo crece en forma de hifas dicarióticas que solo se desarrollan en el interior del huésped. Esta fase se inicia con el apareamiento de dos células que comparten *loci* de apareamiento (sexuales) *a* y *b* compatibles (ver adelante). La cercanía de células compatibles provoca una inhibición de la gemación y la formación de filamentos delgados (tubos de conjugación) que se dirigen el uno hacia el otro por una acción quimiotrópica, para finalmente fusionarse en el extremo apical para formar el micelio dicariótico infeccioso, el cual continúa su crecimiento y es capaz de invadir a un huésped susceptible a través de aberturas naturales, por los estomas, por los órganos florales, o activamente formando un apresorio. Se ha sugerido que los estigmas son la más importante ruta de infección, ya que los tumores presentes en las mazorcas son los más prominentes. Es importante señalar que también los diploides son infecciosos, pero no las cepas haploides. En el interior de la planta el hongo crece de manera intracelular o extracelular sin causar gran daño al huésped originalmente en forma de micelio delgado (ver Fig. 2A). La mayor parte del crecimiento ocurre en los tejidos meristemáticos de la planta con la formación final de las agallas o tumores en los cuales ocurre la esporulación del hongo. Las hifas adquieren formas irregulares (Fig. 2B,C) y se fragmentan, cubriendose finalmente con una pared gruesa equinulada y pigmentada (Fig. 2D) (Banuett y Herskowitz 1996). Durante una fase de este proceso ocurre la citocinesis con la formación del estado diploide del hongo. Las esporas maduras (teliosporas) son liberadas cuando las agallas se secan y se abren. Las teliosporas constituyen el estado diploide del hongo y hasta el momento no se ha logrado su formación fuera de las plantas de maíz o teozintle. Los síntomas de la enfermedad son principalmente la formación de tumores, aunque también ocurren clorosis, distorsiones y enanismo de la planta y acumulación de antocianinas. La inducción de tumores probablemente involucra fitohormonas y citocininas como ocurre en algunas infecciones de plantas producidas por bacterias fitopatógenas; sin embargo su naturaleza no ha sido aún determinada. Las teliosporas germinan rápidamente en un medio nutritivo e incluso en agua, aunque se ha descrito que la presencia de disacáridos favorece el proceso. La germinación de la teliospora se inicia con la formación de un tubo germinativo denominado promicelio. El núcleo de la espora migra hacia el promicelio y en este punto ocurre la meiosis. A partir del promicelio se forman cuatro basidiosporas en forma acropétala las cuales geman para reiniciar el ciclo de vida.

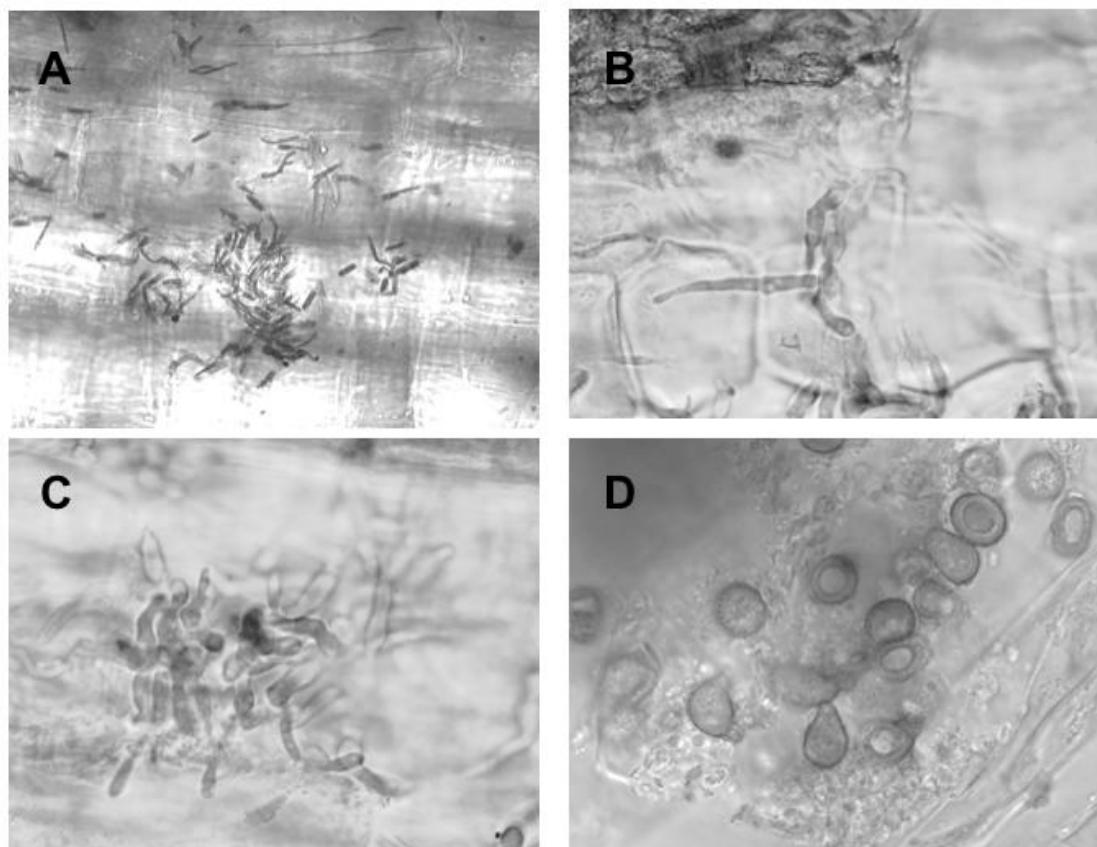


Figura 2. Fotografías del crecimiento de *U. maydis* en una planta de maíz inoculada experimentalmente. Plántulas de maíz fueron inoculadas por inyección con una mezcla de dos cepas sexualmente compatibles. A intervalos se obtuvieron cortes finos de distintas plantas, se tiñeron con lactofenol-azul de algodón y se observaron en un microscopio. A, cortes obtenidos a los 2 días de la inoculación; se observan las esporidias del hongo en el interior de la planta, algunas están en un proceso de apareamiento. B y C, hifas con morfología alterada creciendo en el interior de la planta a los 5 días de inoculación, en B se observa una hifa cruzando de una a otra célula del tejido vegetal. D, formación de teliosporas al cabo de 10 días de inoculación. Algunas aparecen inmaduras y con morfología piriforme. Otras son esferoidales y ya poseen la doble pared equinulada. Fig. A, 400X; Figs 2-4, 1000X.

Sexualidad y apareamiento, y su relación con la patogénesis

El apareamiento en *U. maydis* es un fenómeno complejo, siendo de tipo tetrapolar y estando controlado por dos *loci* llamados *a* y *b*, el primero con dos alelos y el segundo con múltiples alelos (Rowell 1955a, 1955b, Holliday 1974). Solamente la unión de células haploides con diferentes *loci* *a* y *b* da lugar a la forma patogénica del hongo. Se ha demostrado que el locus *a* gobierna el apareamiento y la fusión celular (Trueheart y Herskowitz 1992), y que solamente

las células que poseen diferentes alelos *a* pueden fusionarse. Los dos alelos del *locus a* (*a1* y *a2*) han sido clonados y secuenciados, habiéndose demostrado que difieren en el tamaño y secuencia de DNA, 4.5 kpb y 8 kpb para *a1* y *a2* respectivamente (Bölker *et al.* 1992). Dada la diferencia entre ambos, se han denominado como idiomorfos, en vez de alelos, aunque en la literatura aparecen ambas denominaciones. Cada idiomorfo contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF). El primero de ellos denominado *MFA1* para *a1* y *MFA2* para *a2*, codifican los precursores de las feromonas (hormonas sexuales) de *U. maydis* (Spelling *et al.* 1994). Ambas son polipéptidos de 40 aminoácidos para *a1* y 38 aminoácidos para *a2*. Ambas proteínas presentan una secuencia Cis-A-A-X en su extremo carboxilo terminal, la cual es característica de las feromonas de levadura. El segundo ORF en los *loci a1* y *a2* codifica polipéptidos de 357 y 346 aminoácidos respectivamente. Estos segundos ORFs se denominan respectivamente *PRA1* Y *PRA2*, y codifican los receptores de las feromonas producidas por las células del sexo opuesto. Ambos genes están regulados positivamente. Cuando se mezclan células compatibles sexualmente dan lugar a un fenómeno de activación autocrino que inicia el apareamiento, el cual ocurre como se describió anteriormente.

La compatibilidad del *locus b* controla el crecimiento filamento y la patogenicidad de *U. maydis*, independientemente del *locus a*. Varios alelos del *locus b* han sido clonados y secuenciados, demostrándose que cada uno de ellos contiene dos ORF separados que codifican dos polipéptidos de 410 y 626 aminoácidos respectivamente (bE y bW). Ambos polipéptidos contienen una región de homeodominio en la parte central, con dominios variables separados, así como una región constante con una homología del 90% entre los diferentes alelos analizados. La funcionalidad del *locus b* depende de que las células que se aparean posean diferentes alelos *b*. Las proteínas bE y bW pertenecientes a diferentes alelos se asocian para dar lugar a un heterodímero que actúa como un factor de transcripción específico para la síntesis de factores que intervienen en el proceso patogénico (Yee y Kronstad 1998).

Más recientemente, un consorcio internacional del cual forma parte nuestro grupo de investigación, llevó a cabo el análisis funcional del genomio de *U. maydis* (Kämper *et al.* 2006). De forma sobresaliente se observó que un número significativo de los genes del hongo codifican enzimas de secreción ordenados en 12 grupos contenido de 3 a 26 genes cada uno (“islas de

patogenicidad”), y que se hallan distribuidos en todo el genomio. La expresión de estos grupos de genes es controlada durante la infección del huésped natural, sugiriendo una función coordinada durante el desarrollo patogénico. La interrupción de cada una de estas “islas”, condujo a una disminución en la patogenicidad. El relativamente bajo número de enzimas hidrolíticas, su asociación génica y la regulación de su expresión, revelan la estrategia de un hongo biotrófico que no afecta severamente el crecimiento de su huésped, sino hasta las últimas etapas de la infección.

Ciclo de vida *in vitro*

Nosotros hemos desarrollado un sistema para inducir el ciclo de vida de *U. maydis in vitro* (Ruiz-Herrera *et al.* 1999). Para ello se diseñaron unas cámaras especiales de acrílico con una membrana semipermeable sobre las que se depositan mezclas de células sexualmente compatibles, o diploides. Bajo la membrana se colocan callos embriogénicos de maíz que se desarrollan en un medio sólido para plantas. Con ello se establece una comunicación molecular entre el callo y el hongo, sin que exista una unión física entre ambos. El crecimiento de la forma micelial de las cepas de *U. maydis*, incluso de mutantes auxotróficas, indicaba que éstas obtenían sus nutrientes de los callos, y que además estos producían substancias que estimulaban el crecimiento micelial, ya que sobre el mismo medio de cultivo, *U. maydis* crecía en forma de levadura. Al final de un par de semanas *U. maydis* producía células semejantes a teliosporas, que sin embargo fueron incapaces de germinar. Pero por otro lado, análisis genéticos del hongo crecido en las cámaras, revelaron la existencia de recombinación genética, por primera vez obtenida fuera de la planta. La diferenciación morfológica de las células meristemáticas de los callos, a su vez reveló la acción de inductores producidos por el hongo, tal como debe ocurrir en condiciones naturales.

Infección en huéspedes no naturales

El análisis de la interacción huésped-parásito en el patosistema *U. maydis*-maíz es sumamente complejo ya que involucra fenómenos morfogenéticos (dimorfismo) y sexuales (apareamiento), que pueden obscurecer el fenómeno parasítico en sí mismo. En la literatura

moderna, el uso de modelos de estudio más simples ha sido reconocido como una estrategia muy útil para vencer los obstáculos de los sistemas naturales. Por ello nosotros procedimos a analizar la capacidad de diploides y mezclas sexualmente compatibles de *U. maydis* para infectar a otras plantas filogenéticamente separadas e incluso muy distantes de los huéspedes naturales del hongo: sorgo, cebada, trigo, ajo, tabaco y papaya (León-Ramírez *et al.* 2001). Estas plantas inoculadas en condiciones axénicas, presentaron un crecimiento micelial del hongo sobre la planta, el cual no solamente ocurrió en el sitio de inoculación y en áreas cercanas a éste, sino también en zonas alejadas, lo cual fue demostrado en estudios por microscopía, y también por medio de la amplificación de fragmentos de DNA específicos por medio de la técnica de PCR. Los síntomas que principalmente se presentaron en esas plantas fueron la presencia de clorosis, la producción de antocianinas, la reducción de su crecimiento, el desarrollo de malformaciones o de raíces adventicias (indicadores de la capacidad tumoral de *U. maydis*) y en algunos casos marchitamiento y muerte. Posteriormente seleccionamos a *Arabidopsis thaliana* como huésped alternativo (Méndez-Morán *et al.* 2005). Entre las características apetecible de *A. thaliana* podemos citar: su pequeño tamaño, la facilidad de crecer grandes poblaciones bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento, su ciclo vital muy corto, el conocimiento del genomio total de *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), y la existencia de mutantes afectadas prácticamente en todos y cada uno de los genes de la planta. El primer signo de la infección de *A. thaliana* por *U. maydis* es el desarrollo de micelio en las zonas superficiales cercanas al sitio de infección. Posteriormente se observa la entrada del hongo a la planta a través de los estomas. Esto es seguido por el desarrollo de *U. maydis* en los tejidos de la planta y la aparición de síntomas semejantes a los observados en plantas de maíz infectadas con el hongo: clorosis, producción aumentada de antocianinas, enanismo, malformaciones, hiper-desarrollo radicular, necrosis y eventualmente la muerte de la planta. Interesantemente, mutantes aisladas por nosotros que son avirulentas en el maíz, tampoco fueron virulentas en *Arabidopsis*. Sin embargo ni en *Arabidopsis*, ni en el resto de los huéspedes alternativos ocurrió la formación de teliosporas, lo que revela que el ciclo sexual de *U. maydis* solo se puede completar en los huéspedes naturales. Una observación inesperada fue la demostración de que las cepas haploides eran casi tan virulentas como las mezclas de haploides sexualmente compatibles o diploides, lo cual revela la existencia de un mecanismo que no requiere del heterodímetro bE/bW para desencadenar el proceso infeccioso. Más recientemente hemos procedido a la identificación de

genes de *Arabidopsis* cuya transcripción se altera durante el proceso patogénico, por medio de trampas génicas (Reynaga-Peña *et al.* 2006) y por uso de microarreglos (Mendez-Moran *et al.* 2008).

Dimorfismo *in vitro*

Como se describió líneas arriba, *U. maydis* alterna durante su ciclo vital estadios levaduriforme y micelial. Este proceso (transición de los hongos de una forma de levadura a otra de micelio y viceversa, de acuerdo con las condiciones ambientales) se denomina dimorfismo. La transición dimórfica en *U. maydis* ocurre durante el apareamiento de dos esporidias sexualmente compatibles y se puede observar al mezclar dos cepas con esa característica en placas de un medio sólido contenido carbón activado. El micelio dicariótico formado por las cepas que aparean, aparece en forma de colonias blancas de aspecto algodonoso; en tanto que aquellas que no aparean forman colonias de color grisáceo formadas por levaduras. Esta prueba (FUZ; Day y Anagnostakis 1971, Banuett y Herskowitz 1989) se utiliza rutinariamente para determinar el tipo de apareamiento de las cepas de *U. maydis*. *In vitro*, los dicariones son inestables, aunque bajo ciertas condiciones pueden formar diploides, que dan una reacción FUZ positiva. En condiciones de ayuno de nitrógeno los dicariones pueden crecer de forma micelial en medios líquidos (Banuett y Herskowitz 1994). Gold *et al.* (1994) aislaron una mutante, posteriormente identificada como deficiente en adenilato ciclase (*uac1*), que crece en forma micelial, demostrando que la heterocariosis en el gen *b*, no es indispensable para el desarrollo del micelio.

Nosotros desarrollamos condiciones para el crecimiento del hongo alternativamente en forma de levadura o de micelio, por medio del control del pH del medio (Ruiz-Herrera *et al.* 1995). *U. maydis* crece como micelio a un pH ácido con un óptimo a pH 3, y como levadura a un pH cercano a la neutralidad (Fig. 3). Esta transición dimórfica la llevan a cabo no solo los diploides, sino también las cepas haploides, e incluso cepas deficiente en el gen *b*, confirmando el no-requerimiento de este gen para el crecimiento micelial. El aislamiento de mutantes que no eran capaces de formar micelio *in vitro* a pH ácido, y la observación de que eran capaces de aparear, pero que mezclas sexualmente compatibles de cada una de ellas eran avirulentas, demostró que la forma infectiva de *U. maydis* es la micelial (Martínez-Espinoza *et al.* 1997). Actualmente realizamos estudios con microarreglos para identificar los genes que se regulan

positiva o negativamente durante el crecimiento *in vitro* del hongo en los estadio de micelio o levadura.

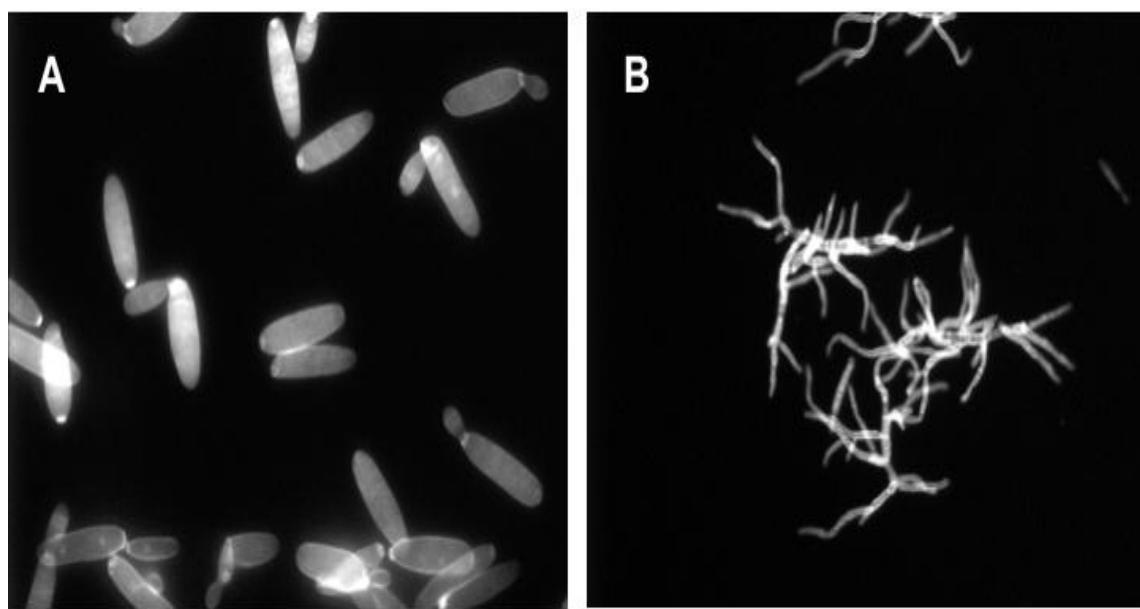


Figura 3. Dimorfismo *in vitro* de *Ustilago maydis*. A, levaduras crecidas en un medio de pH 7 (1000X). B, micelio desarrollado en un medio de pH 3 (400X).

Las vías de transducción de señales en la morfogénesis y la patogénesis

¿Cómo se reciben y transmiten en *U. maydis* las señales del medio para regular el apareamiento y la transición dimórfica, y de la planta en la patogénesis? Se ha demostrado que *U. maydis* posee vías de transducción de señales PKA, dependientes de AMPc y al menos una vía de MAP cinasas (MAPK). Antes se describió que una mutante afectada en la adenilato ciclase (*uac1*; Gold *et al.* 1994) solo crecía en forma micelial. Esto condujo a pensar que la vía PKA estaba involucrada en el crecimiento levaduriforme. Con el objeto de identificar a los elementos involucrados en el crecimiento micelial, se procedió a buscar supresores del fenotipo debido a la mutación en el gen *Uac1*, o sea mutantes que crecieran en forma de levaduras. De esta manera se identificó una serie de genes que fueron denominados *Ubc* (*Ustilago Bypass of Cyclase*). Como sería de esperarse, entre los genes identificados se encontró el que codifica la subunidad regulatoria de la PKA. Pero interesantemente, el resto de los genes codificaba los miembros de un módulo MAPK, sugiriendo que mientras la vía PKA está involucrada en el crecimiento

levaduriforme, la vía MAPK lo está en el crecimiento micelial (véase revisión de Martínez-Espinoza *et al.* 2002). Posteriormente nosotros demostramos que la adición de AMPc inhibía el crecimiento micelial a pH ácido y que las mutantes afectadas en cualquiera de los genes *Ubc* eran incapaces de crecer en forma micelial (Martínez-Espinoza *et al.* 2004). Estos resultados demostraron que las vías de transducción de señales PKA y MAPK son antagónicas en *U. maydis*; mientras la primera favorece el crecimiento levaduriforme, la segunda favorece el crecimiento micelial. Estos resultados demostraron además que la forma normal del crecimiento del hongo es como levadura. En lo que se refiere al apareamiento, los resultados obtenidos con el empleo de mutantes indican que las feromonas se unen a su receptor específico (ver arriba), y que la señal se transfiere al núcleo por medio de una vía MAPK, probablemente sin la intervención de una proteína G trimérica (ver Sánchez Martínez y Pérez-Martín 2001, Martínez-Espinoza *et al.* 2002). La mutación de algún miembro de la vía conduce a la esterilidad. Esta misma vía está involucrada en la patogénesis, ya que mutantes afectadas en cualquiera de sus miembros son avirulentas. Por otro lado, la demostración de que la mutante *uac1* es también avirulenta indica que, contrariamente a lo ocurre en el caso de la morfogénesis, la operación de ambas vías, MAPK y PKA, es requerida para la virulencia.

Referencias

- Banuett, F. (1991). *Ustilago maydis*, the delightful blight. Trends Genet. 8: 174-180.
- Banuett, F. y Herskowitz, I. (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. Exp. Mycol. 18: 247-266.
- Banuett F. y Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122: 2965-2976.
- Bölker, M., Urban, M. y Kahmann, R. (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. Cell. 68: 441-450.
- Caltrider, P. G. y Gottlieb, D. (1965). Effect of sugar on germination and metabolism of *Ustilago maydis*. Phytopathology 56: 479-484.
- Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Monograph No. 2. American Phytopathological Society.

- Gold, S., Duncan, G., Barret, K. y Kronstad, J. (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Develop.* 8: 2805-2816.
- Holliday, R. (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res.* 2: 204-230.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. En: *Handbook of Genetics*, Vol. 1, pp 575-595. Ed. King, R. C. Plenum Press, N.Y.
- Kämper, J., Kahmann, R., Böker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzmán, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greillinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sánchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Han, I., Vaupel, M., Koopman, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlueter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes H-W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B. W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444, 97-101.
- Martínez-Espinoza, A. D., García-Pedrajas, M. D. y Gold, S. E. (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet. Biol.* 35: 1-20.
- Martínez-Espinoza, A. D., León, C., Elizarraraz, G. y Ruiz-Herrera, J. (1997). Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 87: 259-265.
- Martínez-Espinoza, A. D., Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C. G. y Gold, S. E. (2004). MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Curr. Microbiol.* 49: 274-281.
- Mendez-Morán, L., Ibarra-Laclette, E. y Ruiz-Herrera, J. (2007). Identification of genes regulated in the *Ustilago maydis-Arabidopsis thaliana* pathosystem. IV Internacional Ustilago Meeting. Schloss Rauischholzhausen, Alemania. Proceedings, p. 46.

- Méndez-Morán, L., Reynaga-Peña, C. G., Springer, P. S. y Ruiz-Herrera, J. (2005). *Ustilago maydis* infection of the non-natural host *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 95: 480-488.
- Perkins, D. D. (1949). Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* 34: 607-626.
- Reynaga-Peña, C. G., Méndez-Morán, L., Jablonska, B., Springer, P.S., León- Ramírez, C. y Ruiz-Herrera, J. (2006). The *Ustilago maydis*-*Arabidopsis thaliana* pathosystem as a model for fungal-plant interactions. *Biology of Plant-Microbe Interactions* 5: 606-610.
- Rowell, J. B. (1955a). Functional role of compatibility factors and in vitro test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zaeae*. *Phytopathology* 45: 370-374.
- Rowell, J. B. (1955b). Segregation of sex factors in a diploid line of *Ustilago zaeae* induced by α radiation. *Science* 1231: 304-306.
- Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C., Cabrera-Ponce, J. L., Martínez-Espinoza, A. D. y Herrera-Estrella, L. (1999). Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis* in vitro. *Mol. Gen. Genet.* 262: 468-472.
- Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C. G., Guevara-Olvera, L. y Cáraez-Trejo, A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141: 695-703.
- Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C. y Martínez-Espinoza, A. D. (2000). Morphogenesis and pathogenesis in *Ustilago maydis*. *Recent Res. Develop. Microbiol.* 4: 585-598.
- Sánchez-Martínez, C. y Pérez-Martín, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Curr. Opinion Microbiol.* 4: 214-221.
- Spellig, T., Bolker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. y Kahmann, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal*. 13: 1620-1627.
- Trueheart, J. y Herskowitz, I. (1992). The a locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. *J. Bacteriol.* 174: 7831-7833.
- Yee, A. R. y Kronstad, J. W. (1998). Dual sets of chimeric alleles identify specificity sequences for the *bE* and *bW* mating and pathogenicity genes of *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* 18: 221-232.