



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencia de los Alimentos

**RELACIÓN DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO CON LA CAPACIDAD DE  
*Ustilago maydis* (HUITLACOCHÉ) DE INDUCIR TUMORES EN MAÍZ**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

**FIDEL GUEVARA LARA**

**Dirigido por:**

**DR. OCTAVIO PAREDES LÓPEZ**

**SINODALES**

DR. OCTAVIO PAREDES LÓPEZ  
Presidente

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ  
Secretario

DR. PLINIO ANTONIO GUZMÁN VILLATE  
Vocal

DR. VÍCTOR OLALDE PORTUGAL  
Vocal

DR. J. FÉLIX GUTIÉRREZ CORONA  
Vocal

DR. OCTAVIO MARTÍNEZ DE LA VEGA  
Suplente

DR. EDMUNDO MERCADO SILVA  
Suplente

Q.M. J. MERCEDES ESPARZA GARCÍA  
Directora de la Facultad de Química

DRA. MA. GUADALUPE BERNAL SANTOS  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Marzo de 1999  
México

No. Adq. H59899  
No. Título \_\_\_\_\_  
Clas. 664.8058  
G939r  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Octavio Paredes López.

## RESUMEN

El carbón común del maíz, causado por *Ustilago maydis* (DC) Corda, se caracteriza por formación de tumores/agallas en partes aéreas de la planta. En México, se denomina *huitlacoche* a las agallas jóvenes que *U. maydis* induce en mazorcas inmaduras. El huitlacoche se ha consumido como alimento durante siglos, y existe interés en desarrollarlo como producto de alto valor agregado, en vista de su aceptación y demanda como hongo comestible. Sin embargo, el desarrollo tecnológico para su producción a gran escala se ha visto mermado por falta de conocimiento sobre los factores que determinan la eficiencia de infección. Se sabe que *U. maydis* produce la auxina ácido indol-3-acético (AIA), y se ha sugerido que éste podría estar involucrado en la formación de las agallas. Sin embargo, no se ha determinado si la capacidad de *U. maydis* de producir AIA *in vitro* está relacionada con su capacidad de inducción de tumores. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación entre la producción *in vitro* de AIA por *U. maydis* y la capacidad del hongo de inducir la formación de tumores en plantas de maíz (*Zea mays*). Se analizó el crecimiento, la producción *in vitro* de AIA, la capacidad de apareamiento *in vitro* y la capacidad infectiva en plántulas de maíz, de cepas silvestres, mutantes y transformadas de *U. maydis*. Casi todas las cepas produjeron AIA *in vitro* alcanzando niveles máximos durante la fase estacionaria de crecimiento; después del máximo, los niveles disminuyeron hasta un 75%, siendo el hongo el responsable de la disminución. Se generaron tres cepas mutantes auxotróficas de *U. maydis* con producción *in vitro* de AIA nula o disminuida (fenotipo AIA<sup>-</sup>). La mutagénesis con ácido clofibrico resultó ser la técnica más útil para su aislamiento. El análisis de la mutante nula *udi1* reveló que ésta posee una auxotrofia para metionina ligada a la mutación AIA<sup>-</sup>, que fue posible separar la auxotrofia del fenotipo AIA<sup>-</sup>, y que la mutación AIA<sup>-</sup> podría estar localizada en el mismo grupo de ligamiento en el que se encuentra el locus *b* de apareamiento. La menor infectividad de las mutantes sugiere que el (los) gen(es) afectado tiene que ver con la patogenicidad del hongo; en particular, la evidencia apoya la hipótesis de que las cepas de *U. maydis* requieren de la capacidad de producir AIA para ser infectivas. Las cepas haploides fueron más infectivas que las cepas solopatogénicas. La alta producción de AIA *in vitro* no predijo que las cepas desarrollaran alta infectividad. Todas las cepas infectivas produjeron AIA en niveles relativamente altos, lo que apoya la hipótesis de que el AIA juega un papel importante en la patogenicidad. Se construyeron cepas transformadas con el gen bacteriano *iaaL* (indolacetil-lisina sintetasa), que inactiva al AIA conjugándolo covalentemente a la lisina. El AIA libre *in vitro* disminuyó hasta un 80% en algunas cepas transformadas. Estas cepas mostraron menor capacidad infectiva en plántulas de maíz. Los resultados apoyan la hipótesis de que el AIA producido por *U. maydis* juega un papel importante en la capacidad del hongo de desarrollar los tumores en la infección.

**(Palabras clave:** *Ustilago maydis*, huitlacoche, ácido indol-3-acético, patogenicidad, tumor, auxina, fitohormona, mutante, *iaaL*, *Zea mays*)

## SUMMARY

Common smut of maize, caused by *Ustilago maydis* (DC) Corda, is characterized by tumor or gall formation on aerial parts of the plant. In Mexico, young galls growing on immature corn ears are known as *huitlacoche*. Huitlacoche has been consumed as food for centuries, and there is interest in its development as a high value-added product, in view of its acceptance and demand as a novel edible "mushroom". However, technological development for mass production has been hindered by lack of knowledge on factors governing infection efficiency. It is known that *U. maydis* can synthesize the auxin indole-3-acetic-acid (IAA), and it has been suggested that this could be involved in tumor formation. However, it has not been determined whether the ability of *U. maydis* to produce IAA *in vitro* is related to its ability for tumor induction. The objective of this work was to study the relation between *in vitro* IAA production by *U. maydis* and the ability of the fungus to induce tumors in maize (*Zea mays* L.) plants. Growth, *in vitro* IAA production, ability of *in vitro* mating, and the infective capacity were analyzed in wild-type, mutant, and transformed strains of *U. maydis*. Most strains produced IAA *in vitro* reaching maximum levels during the stationary phase of growth; after the maximum, those levels decreased up to 75%, the fungus being responsible for the decrease. Three auxotrophic mutant strains were generated; they showed null or diminished IAA production *in vitro* (IAA<sup>-</sup> phenotype). Chlorobiotic acid mutagenesis was the most efficient technique for their isolation. Analysis of null IAA<sup>-</sup> mutant *udi1* revealed linkage between a methionine auxotrophy and the IAA<sup>-</sup> mutation; it was possible to separate the auxotrophy from the IAA<sup>-</sup> phenotype; and the IAA<sup>-</sup> mutation seems to map to the same linkage group where the *b* mating-type locus is located. The lower infective capacity shown by the mutants suggests that the mutant gene(s) is (are) related to pathogenicity of the fungus. In particular, evidence supports the hypothesis that *U. maydis* strains require the ability to produce IAA in order to be infective. Haploid strains were more infective than solopathogenic strains. A high *in vitro* IAA production did not predict high infectivity. All infective strains produced IAA at relatively high levels, which supports the hypothesis that IAA plays an important role in pathogenicity. Transformed strains carrying the *iaaL* (indoleacetyl-lysine synthetase) bacterial gene were constructed; this gene inactivates IAA by covalently conjugating it to lysine. Free IAA *in vitro* diminished up to 80% for some transformed strains. These strains showed a lower infective capacity on maize seedlings. Results support the hypothesis that IAA produced by *U. maydis* plays an important role in the ability of the fungus to induce tumor development during pathogenesis.

**(Key words:** *Ustilago maydis*, huitlacoche, indole-3-acetic acid, pathogenicity, tumor, auxin, phytohormone, mutant, *iaaL*, *Zea mays*)

## DEDICATORIAS

*A Lorena,  
cuyo amor, visión y apoyo  
son mis fuentes de actividad e inspiración.*

*A mis más grandes tesoros  
Julia e Isaías,  
motivos non plus ultra.*

*A Esperanza, mi madre,  
y  
a Fidel, mi padre,  
por su amor, sus cuidados,  
su paciencia, su tiempo,  
sus sacrificios,  
sus ejemplos de vida íntegra,  
sus visiones de esperanza y fe en Dios.*

*A Andrea, Elizabeth e Israel,  
mis hermanos,  
por su cariño y su compañía.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Octavio Paredes López por brindarme la oportunidad de superarme; por su dirección, apoyo y estímulo siempre presentes; y por aceptarme como parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Carlos Regalado González y al M. en C. Jorge Álvarez Domínguez por su amable gestión, estímulo y gran ayuda, y por sus valiosas revisiones y acertadas observaciones al trabajo de tesis.

A los doctores Plinio Antonio Guzmán Villate, Víctor Olalde Portugal, J. Félix Gutiérrez Corona, Octavio Martínez de la Vega, Edmundo Mercado Silva y George J. Vandemark por formar parte de mis comités de examen predoctoral y de tesis, y por su valiosa ayuda en el desarrollo y revisión de este trabajo, así como por sus acertados comentarios y constructivas observaciones al escrito de la tesis.

A la Dra. Elvira González de Mejía por su motivación, apoyo y amable gestión para seguir adelante.

Al Dr. James W. Kronstad, profesor asociado del Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia, Canadá, por aceptarme en su laboratorio para iniciar el presente trabajo de tesis, así como por todas las valiosas ideas y comentarios aportados al desarrollo del mismo.

A la Dra. María Elena Valverde González por su gran amistad y valiosísima ayuda en el desarrollo del trabajo y en la revisión del escrito de tesis; así como a los doctores Ángel Gabriel Alpuche Solís y Francisco Delgado Vargas por su amistad y estímulo a través de esas memorables pláticas y discusiones, a veces académicas y a veces no.

A la I.A. María Elena Sosa Morales, al M.C. Víctor Manuel Martínez Juárez, al I.B.Q. Juan Bernardo Velázquez Montoya, a la Srita. Melody Yunuén Cordero de los Santos y al Sr. José Alberto Torres Chayre por su gran ayuda en el laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos, los presentes y los que se han ido, del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, de la Unidad Irapuato, CINVESTAV-IPN, por su gran amistad, por todos los detalles y por su valiosa ayuda y motivación.

Al Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón y a los miembros de su laboratorio por facilitarme sus microscopios y equipo fotográfico.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Química, al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, y a todas las personas en estas instituciones que de una forma u otra me proporcionaron el medio ambiente académico y el apoyo económico para alcanzar esta meta.

Agradezco profundamente a toda la comunidad de la Unidad Irapuato del CINVESTAV-IPN, así como a la Institución misma por todo su apoyo y amistad durante estos años.

Al SIHGO, al SNI y al CONACYT por los apoyos económicos otorgados para la realización de este trabajo de investigación.

A la familia Sandoval Cardoso por su cariño y su apoyo y por aceptarme como uno más de sus miembros.

A Dios por darme vida, salud, y alegría en la realización de mis anhelos.

# ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	x
Índice de figuras	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Reguladores de crecimiento y ácido indol-3-acético (AIA) en plantas y microorganismos	3
2.1.1. Generalidades	3
2.1.2. Producción de AIA por plantas y microorganismos	3
2.1.3. Métodos de detección y análisis del AIA	4
2.1.4. Biosíntesis y metabolismo del AIA	5
2.1.4.1. <i>Vías del triptofano</i>	7
2.1.4.1.1. <i>Vía de la indol-3-acetamida (Iam)</i>	7
2.1.4.1.2. <i>Vía de la triptamina</i>	9
2.1.4.1.3. <i>Vía del ácido indol-3-pirúvico</i>	9
2.1.4.1.4. <i>Vía del triptofol (indol-3-etanol)</i>	11
2.1.4.1.5. <i>Vía del indol-3-acetonitrilo</i>	12
2.1.4.2. <i>Vías independientes del triptofano</i>	13
2.1.4.3. <i>Conjugación del AIA</i>	13
2.1.5. Papel de las auxinas en interacciones planta- microorganismo	15
2.1.5.1. <i>Simbiosis</i>	16
2.1.5.2. <i>Interacciones con bacterias fitopatogénicas</i>	17
2.1.5.3. <i>Interacciones con hongos fitopatogénicos</i>	20
2.1.5.4. <i>Uso de genes de biosíntesis y metabolismo                 de AIA como herramientas</i>	21
2.2. <i>Ustilago maydis</i> - Carbón común del maíz y huitlacoche	21
2.2.1. El fitopatógeno, el modelo biológico y el hongo comestible	21
2.2.2. Descripción del fitopatógeno y su ciclo de vida	24

	Página
2.2.3. Mecanismos moleculares de fitopatogenicidad	24
2.2.4. Versatilidad del modelo biológico	26
2.2.5. Síntesis de ácido indol-3-acético <i>in vitro</i> y formación de agallas en planta	26
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos específicos	32
V. METODOLOGÍA	33
5.1. Materiales	33
5.1.1. Cepas y vectores de <i>Ustilago maydis</i>	33
5.1.2. Clona del gen <i>iaaL</i>	35
5.1.3. Cepa de <i>Escherichia coli</i>	35
5.1.4. Plantas de maíz	38
5.2. Métodos	38
5.2.1. Estrategia general de trabajo	38
5.2.2. Curvas de crecimiento y de producción de AIA	40
5.2.2.1. Condiciones de cultivo	40
5.2.2.2. Evaluación del crecimiento de los cultivos	41
5.2.2.3. Aplicación de choque térmico a cultivos de cepas transformadas	41
5.2.3. Detección y cuantificación del AIA	41
5.2.3.1. Selección del reactivo de Salkowski	41
5.2.3.2. Cuantificación mediante el reactivo de Salkowski	42
5.2.3.3. Cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	43
5.2.4. Mutagénesis y selección de mutantes	44
5.2.5. Análisis de mutantes AIA <sup>-</sup>	46
5.2.6. Construcción de vectores de expresión de <i>U. maydis</i> con el gen <i>iaaL</i>	47
5.2.6.1. Digestión de los plásmidos y cuantificación de DNA	47
5.2.6.2. Purificación del fragmento de DNA conteniendo al gen <i>iaaL</i>	48
5.2.6.3. Reacciones de ligación	48

	<b>Página</b>
5.2.6.4. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	48
5.2.6.5. Transformación de <i>E. coli</i>	49
5.2.6.6. Minipreparación de DNA de plásmidos	49
5.2.6.7. Análisis de restricción de las construcciones	50
5.2.6.8. Maxipreparaciones de DNA de las construcciones	50
5.2.7. Transformación de <i>U. maydis</i> y selección de transformantes	50
5.2.7.1. Formación de esferoplastos	50
5.2.7.2. Transformación de las cepas seleccionadas de <i>U. maydis</i>	51
5.2.7.3. Nomenclatura de cepas transformadas de <i>Ustilago maydis</i>	52
5.2.8. Confirmación de transformación de <i>U. maydis</i> mediante análisis de Southern	52
5.2.8.1. Obtención de DNA de las cepas sin transformar y transformadas	52
5.2.8.2. Purificación del DNA total	55
5.2.8.3. Digestiones del DNA total	56
5.2.8.4. Transferencia del DNA a la membrana	56
5.2.8.5. Marcaje radiactivo por iniciador de secuencia al azar ("random priming")	56
5.2.8.6. Condiciones de prehibridación	57
5.2.8.7. Condiciones de hibridación	57
5.2.9. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz	57
5.2.9.1. Preparación del inóculo	57
5.2.9.2. Siembra e inoculación de plántulas	58
5.2.9.3. Calificación de síntomas de infección	60
5.2.10. Determinación de capacidad de sobrevivencia en agua	60
5.2.11. Análisis de resultados	61
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
6.1. Obtención y análisis de mutantes AIA <sup>-</sup> de <i>Ustilago maydis</i>	62
6.1.1. Determinación de la formulación del reactivo de Salkowski más adecuada para cuantificar AIA	62
6.1.2. Curvas de crecimiento y de producción y estabilidad de AIA de cepas silvestres	63

6.1.3. Mutagénesis y selección de mutantes AIA <sup>-</sup>	65
6.1.4. Crecimiento de las mutantes AIA <sup>-</sup> en medio mínimo de Czapek-Dox y en caldo papa-dextrosa	70
6.1.5. Crecimiento y producción <i>in vitro</i> de AIA por las cepas mutantes AIA <sup>-</sup>	74
6.1.6. Pruebas de apareamiento <i>in vitro</i>	77
6.1.7. Obtención y selección de cepas progenie AIA <sup>-</sup> compatibles	79
6.1.8. Análisis de cepas progenie AIA <sup>-</sup> compatibles	84
6.1.8.1. Curvas de crecimiento y de producción <i>in vitro</i> de AIA	84
6.1.8.2. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz	84
6.1.8.3. Capacidad de sobrevivencia en agua	87
6.1.9. Obtención y análisis de cepas progenie AIA <sup>-</sup> compatibles prototróficas	89
6.1.9.1. Selección	89
6.1.9.2. Pruebas de apareamiento <i>in vitro</i>	90
6.1.9.3. Curvas de crecimiento y de producción <i>in vitro</i> de AIA	90
6.1.9.4. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz	92
6.1.9.5. Capacidad de sobrevivencia en agua	96
6.2. Análisis de cepas silvestres de <i>Ustilago maydis</i>	99
6.2.1. Curvas de crecimiento y de producción <i>in vitro</i> de AIA	99
6.2.2. Pruebas de apareamiento <i>in vitro</i>	104
6.2.3. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz	106
6.3. Obtención y análisis de cepas de <i>Ustilago maydis</i> transformadas con el gen <i>iaaL</i>	110
6.3.1. Construcción de los vectores de <i>U. maydis</i> con el gen <i>iaaL</i>	110
6.3.2. Detección de las construcciones portadoras del gen <i>iaaL</i> en el DNA total de <i>U. maydis</i> mediante análisis tipo Southern	110
6.3.3. Curvas de crecimiento y de producción de AIA de las cepas transformadas	115
6.3.3.1. Cepas transformadas con el vector pUBLEX1 conteniendo el gen <i>iaaL</i>	116
6.3.3.2. Cepas transformadas con el vector pUXV10 conteniendo el gen <i>iaaL</i>	121
6.3.4. Pruebas de infectividad de las cepas transformadas con el gen <i>iaaL</i>	123
6.3.4.1. Cepas haploides 002 y Bx722	123

	<b>Página</b>
6.3.4.2. <i>Cepas solopatógenicas D12 y D132</i>	129
VII. CONCLUSIONES	131
VIII. PERSPECTIVAS	133
Literatura citada	134
Apéndice - Símbolos y Abreviaturas	148

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Rasgos fenotípicos de plantas transformadas con genes bacterianos de biosíntesis y metabolismo del ácido indol-3-acético (AIA).	22
2. Cepas de <i>Ustilago maydis</i> utilizadas en este trabajo	34
3. Ejemplo de la nomenclatura empleada para las cepas transformadas de <i>Ustilago maydis</i> .	53
4. Cepas transformadas de <i>Ustilago maydis</i> obtenidas en este estudio.	54
5. Mutagénesis y selección de mutantes AIA <sup>-</sup> de <i>Ustilago maydis</i> .	68
6. Cepas mutantes de <i>Ustilago maydis</i> obtenidas en este estudio.	69
7. Niveles máximos de ácido indol-3-acético (AIA) producidos por cepas silvestres y mutantes de <i>U. maydis</i> , evaluados mediante dos técnicas diferentes.	76
8. Calificaciones de síntomas de infección producidos por cruzas de cepas silvestres [AIA <sup>+</sup> ] y mutantes <i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> ) [AIA <sup>-</sup> ] de <i>Ustilago maydis</i> en plántulas de maíz.	86
9. Calificaciones de síntomas de infección producidos por cruzas de cepas silvestres y mutantes de <i>Ustilago maydis</i> en plántulas de maíz.	93
10. Calificaciones de síntomas de infección producidos por cruzas de cepas silvestres (sin transformar) y transformadas de <i>Ustilago maydis</i> en plántulas de maíz.	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Rutas propuestas para la biosíntesis de ácido indol-3-acético a partir de triptofano en plantas, bacterias y hongos.	6
2. Ejemplos de enfermedades que involucran formación de tumores por microorganismos patogénicos de plantas.	8
3. Posibles rutas independientes del triptofano (Trp) para la biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) en plantas.	14
4. Huitlacoche en diversas presentaciones. A) Agallas tiernas en mazorcas inmaduras de maíz, B) Platillo típico: quesadillas de huitlacoche, C) Producto enlatado y deshidratado.	23
5. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> .	25
6. Vectores de expresión de <i>Ustilago maydis</i> .	36
7. A) Mapa del plásmido pMON690 que contiene al gen <i>iaaL</i> de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> . B) Mapa del fragmento BgIII-BamHI de 1.8 kpb que contiene al gen <i>iaaL</i> .	37
8. Esquema general de trabajo utilizado en el presente estudio.	39
9. Inoculación de plántulas de maíz en pruebas de infectividad en invernadero.	59
10. Curvas de crecimiento y de producción y estabilidad de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas silvestres FB1 y FB2 de <i>Ustilago maydis</i> , cultivadas en medio PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	64
11. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas silvestres FB2, 001 y 002 de <i>Ustilago maydis</i> , cultivadas en medio PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	66
12. Morfología de colonias de la cepa silvestre FB2 (A) y de las cepas mutantes AIA <sup>-</sup> <i>udi2</i> (B) y <i>udi3</i> (C) de <i>Ustilago maydis</i> , cultivadas en medio mínimo de Czapek-Dox sólido durante 16 días a 30 °C.	71

Figura	Página
13. Crecimiento de la cepa silvestre FB2 (A) y de las cepas mutantes AIA <sup>-</sup> <i>udi1</i> (B) y <i>udi2</i> (C) de <i>Ustilago maydis</i> en medio mínimo de Czapek-Dox sólido suplementado con L-metionina.	72
14. Morfología de esporidias de la cepa silvestre FB2 (A) y de las cepas mutantes AIA <sup>-</sup> <i>udi1</i> (B) y <i>udi3GR</i> (C) de <i>Ustilago maydis</i> , cultivadas en caldo papa-dextrosa durante 48 h a 30 °C y 200 rpm.	73
15. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas silvestre FB2, y de las cepas mutantes <i>udi1</i> , <i>udi2</i> , <i>udi3PQ</i> y <i>udi3GR</i> de <i>Ustilago maydis</i> , cultivadas en medio PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	75
16. Pruebas de apareamiento <i>in vitro</i> de las cepas mutantes AIA <sup>-</sup> <i>udi1</i> (A), <i>udi2</i> (B) y <i>udi3GR</i> (C) de <i>Ustilago maydis</i> .	78
17. Agallas en tallos de plántulas de maíz producidas por la cruce de la cepa silvestre FB1 (AIA <sup>+</sup> ) con la cepa mutante <i>udi1</i> (AIA <sup>-</sup> ) de <i>Ustilago maydis</i> .	80
18. Colonias esporidiales progenie de la cruce de la cepa silvestre FB1 (AIA <sup>+</sup> ) con la cepa mutante <i>udi1</i> (AIA <sup>-</sup> ) de <i>Ustilago maydis</i> , cultivadas en medio mínimo de Czapek-Dox sólido durante 72 h a 30 °C.	81
19. Selección con el método de Salkowski de cepas mutantes AIA <sup>-</sup> progenie de la cruce de las cepas FB1 (AIA <sup>+</sup> ) x <i>udi1</i> (AIA <sup>-</sup> ) de <i>Ustilago maydis</i> .	83
20. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepa silvestre FB2, y de cuatro cepas mutantes AIA <sup>-</sup> progenie de la cruce de las cepas FB1 (AIA <sup>+</sup> ) x <i>udi1</i> (AIA <sup>-</sup> ) de <i>Ustilago maydis</i> .	85
21. Capacidad de sobrevivencia en agua a 25 °C de las cepas silvestres FB1 y FB2, y de dos cepas mutantes AIA <sup>-</sup> progenie de la cruce de las cepas FB1 (AIA <sup>+</sup> ) x <i>udi1</i> (AIA <sup>-</sup> ) de <i>Ustilago maydis</i> .	88
22. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas silvestres FB2 y 002, y de siete cepas mutantes progenie de la cruce de las cepas 002 (AIA <sup>+</sup> ) x <i>udi1</i> (AIA <sup>-</sup> ) de <i>Ustilago maydis</i> , en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	91

Figura	Página
23. Mapa de ligamiento de <i>Ustilago maydis</i> .	97
24. Capacidad de sobrevivencia en agua a 25 °C de dos cepas silvestres (FB2 y 002) y de seis cepas mutantes de <i>Ustilago maydis</i> .	98
25. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de seis cepas silvestres de <i>Ustilago maydis</i> , en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	100
26. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de dos cepas silvestres (001 y 002), dos cepas casi isogénicas (Bx711 y Bx722) y tres cepas solopatógenicas (D12, d132 y P6D) de <i>Ustilago maydis</i> , en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	102
27. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de dos cepas silvestres de laboratorio (001 y 002) y cinco cepas aisladas de huitlacoche (P1, P2, T2, T4 y T5) de <i>Ustilago maydis</i> , en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano.	103
28. Separación e identificación de ácido indol-3-acético (AIA) extraído de cultivos de <i>Ustilago maydis</i> en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con triptofano al 0.1% (p/v).	105
29. Capacidad de infectividad en plántulas de maíz de las cruces de cepas haploides 001 x 002, 002 x Bx722 y Bx711 x Bx722, de <i>Ustilago maydis</i> .	107
30. Capacidad infectiva en plántulas de maíz de tres cepas solopatógenicas de laboratorio (D12, d132 y P6D) y de dos cepas solopatógenicas aisladas de huitlacoche (P1 y T4), comparadas con la cruce de cepas haploides 001 x 002, de <i>Ustilago maydis</i> .	108
31. Digestiones de los plásmidos pMON690, pUBLEX1 y pUXV10.	111
32. Mapas que muestran los patrones de corte después de digerir con la enzima XbaI a las construcciones hechas con el gen <i>iaaL</i> y los vectores de expresión de <i>Ustilago</i> pUBLEX1 y pUXV10.	112
33. Análisis de restricción con XbaI de las construcciones portadoras del gen <i>iaaL</i> .	113

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
34. Hibridación (análisis de Southern) de DNA total extraído de cepas de <i>U. maydis</i> no transformadas y transformadas con el gen <i>iaaL</i> , usando como sondas al vector pUBLEX1 digerido con BglIII (A) y al fragmento BglIII-EcoRV de 1.1 kpb del gen <i>iaaL</i> (B).	114
35. A) Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepa silvestre de <i>Ustilago maydis</i> 002 transformada con el vector pUBLEX1 conteniendo el gen <i>iaaL</i> . B) Curvas de producción de AIA después de un choque térmico a las 60 h de incubación.	117
36. A) Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepa casi isogénica de <i>Ustilago maydis</i> Bx722 transformada con el vector pUBLEX1 conteniendo el gen <i>iaaL</i> . B) Curvas de producción de AIA después de un choque térmico a las 60 h de incubación.	119
37. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas 002 (A) y Bx722 (B) de <i>Ustilago maydis</i> transformadas con el vector pUXV10 conteniendo el gen <i>iaaL</i> .	122
38. Plántulas de maíz infectadas con la crusa de cepas 002 x Bx722 de <i>Ustilago maydis</i> .	126
39. Plántulas de maíz infectadas con la crusa de cepas de <i>Ustilago maydis</i> 002 x Bx722 transformadas con el gen <i>iaaL</i> .	127

## I. INTRODUCCIÓN

El carbón común del maíz, causado por el basidiomiceto *Ustilago maydis* (DC) Corda, se caracteriza por la formación de tumores o agallas en las partes aéreas de la planta. Durante muchos años, biólogos y agrónomos han encontrado en *U. maydis* un útil e interesante modelo para estudiar una amplia gama de fenómenos genéticos, fisiológicos y fitopatológicos (Christensen, 1963).

En México, se aplica el nombre de huitlacoche a las agallas jóvenes que *U. maydis* induce en las mazorcas inmaduras del maíz. El huitlacoche se ha consumido tradicionalmente como componente principal de un alimento o como condimento en ocasiones especiales, desde tiempos prehispánicos (Valverde y col., 1995). El interés actual en desarrollar al huitlacoche en un producto de alto valor agregado ha surgido de la creciente aceptación y demanda del producto envasado por ciertos sectores de otros países, donde se ha empezado a considerar como un nuevo hongo comestible. A pesar de esto, el desarrollo tecnológico para la producción de huitlacoche a gran escala se ha visto mermado por falta de conocimiento sobre los factores biológicos que determinan la eficiencia de infección de los elotes del maíz por el hongo. Para producir huitlacoche en gran escala es necesario identificar y desarrollar cepas de *U. maydis*, entre otros factores, que induzcan de manera consistente la formación de agallas en el elote.

En la actualidad, el principal enfoque de la investigación en este sentido es expandir el conocimiento básico de este modelo de interacción planta-patógeno, explorando los factores y mecanismos responsables de la formación de los tumores. A este respecto, diversos trabajos han sugerido que la capacidad de *U. maydis* de producir *in vitro* algunos reguladores de crecimiento típicos de plantas, también conocidos como fitohormonas, podría estar involucrada en la formación de las agallas.

Se sabe que *U. maydis* produce fitohormonas tales como las auxinas y las citocininas (zeatina y derivados) en cultivos agitados. La auxina producida por *U. maydis* es el ácido indol-3-acético (AIA), el cual se ha demostrado que induce la formación de tumores por bacterias fitopatogénicas en sus plantas hospedantes. Ejemplos de que la producción de AIA induce tumores en planta, están dados por *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, bacterias que inducen una variedad de lesiones, agallas y deformidades en los tejidos de sus huéspedes (Yamada, 1993). A pesar de esto, aún no se ha determinado si la capacidad de *U. maydis*, o de cualquier

otro hongo, de producir AIA *in vitro* está relacionada con su capacidad de inducción de tumores en planta.

En vista de la falta de información sobre el tema, es de particular importancia generar evidencia a fin de dilucidar la posible relación entre la capacidad de *U. maydis* de producir AIA en cultivos *in vitro* y su capacidad de inducir tumores en plantas de maíz. Sería sumamente útil conocer mejor los mecanismos de formación de tumores en ésta y otras enfermedades fúngicas en plantas de gran importancia agrícola y económica. Eventualmente, el seguimiento de este conocimiento llevaría a la proposición de estrategias tanto para el control de tales enfermedades, así como para el desarrollo de procedimientos biotecnológicos para la producción controlada de huitlacoche.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Reguladores de crecimiento y ácido indol-3-acético (AIA) en plantas y microorganismos

#### 2.1.1. Generalidades

Las hormonas o reguladores de crecimiento han sido definidos, en referencia a los producidos por las plantas, como sustancias orgánicas que a bajas concentraciones operan sobre procesos fisiológicos, tales como el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo. Tales reguladores juegan un papel crucial controlando las vías y mecanismos mediante los cuales las plantas crecen y se desarrollan, mientras que el metabolismo provee energía y material para la vida. Es decir, regulan la velocidad de crecimiento de las partes individuales e integran esas partes para producir la forma que reconocemos como una planta (Davies, 1995). En años recientes, una gran cantidad de trabajos han abordado el estudio de las cinco principales clases de hormonas o reguladores de crecimiento producidos por las plantas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, y etileno (Gaudin y col., 1994).

#### 2.1.2. Producción de AIA por plantas y microorganismos

El concepto inicial de hormonas en plantas se derivó de los experimentos de Darwin sobre el fototropismo del coleóptilo, los cuales indicaban la presencia de una señal transportada. Alrededor de 1880, Charles Darwin y Theophil Ciesielski fueron los primeros en proponer que una "influencia transmitida" presente en los ápices de brotes vegetales era responsable del gravitropismo, y que por lo tanto afectaba el crecimiento de manera diferencial. Esto condujo a Went a la dilucidación de una "auxina" (del griego "auxein" que significa "aumentar") en 1928, nombre que se aplicó a cualquier compuesto que promovía el crecimiento en bioensayos específicos (Normanly y col., 1995). Ahora se sabe que la principal auxina vegetal, el ácido indol-3-acético (AIA) está involucrado en la regulación de procesos tales como el agrandamiento celular, la división celular, la iniciación de formación de raíces y su crecimiento, los tropismos, la inhibición de yemas y el mantenimiento de la dominancia apical, la senescencia y abscisión de hojas y frutos, la diferenciación vascular, el transporte de metabolitos por el floema, el crecimiento y maduración de los frutos y la floración, entre otros (Guilfoyle y col., 1998; Davies, 1995). Las auxinas se sintetizan principalmente en tejidos meristemáticos, tales como ápices de la raíz y tallo, hojas en desarrollo, flores y

frutos; sin embargo, también se encuentran en otras partes de la planta. Asimismo, se ha observado que la mayor parte del AIA en las plantas se encuentra conjugado a compuestos como los aminoácidos, glucosa y *mio*-inositol, principalmente (Kleczkowski y Schell, 1995).

La capacidad de producir AIA también se halla ampliamente distribuida entre las bacterias y los hongos. Entre las bacterias que producen AIA se encuentran bacterias del suelo, epifíticas y bacterias que colonizan los tejidos de plantas. Se ha sugerido que el 80% de las bacterias aisladas del suelo sintetizan AIA (Loper y Schroth, 1986; Prikryl y col., 1985). Algunas bacterias fitopatogénicas tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *Erwinia herbicola* y dos patovares de *Pseudomonas syringae* también sintetizan AIA, así como otras como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Xanthomonas* y *Bradyrhizobium*, que estimulan el crecimiento en las plantas.

El primer reporte de la producción de auxina por un hongo fue el de Thimann (1935), quien demostró que *Rhizopus suinus* sintetizaba ácido indol-3-acético. Más recientemente se ha visto que hay toda una diversidad de hongos micorrízicos que producen AIA (Ek y col., 1983), así como varios hongos fitopatogénicos (Martínez y col., 1997; Ludwig-Müller y col., 1993; Yamada, 1993).

### **2.1.3. Métodos de detección y análisis del AIA**

Existen una variedad de bioensayos y técnicas colorimétricas e instrumentales que se han utilizado para la detección y análisis del AIA. Los bioensayos fueron los primeros en ser utilizados y se basan en los efectos biológicos del AIA sobre las plantas, tales como la deformación de pelos radicales (prueba de curvatura en *Avena*), o alargamiento de coleóptilos (pruebas con secciones de coleóptilo de trigo o maíz) (Glickmann y Dessaux, 1995). Algunos bioensayos desarrollados recientemente involucran la detección de expresión de genes quiméricos por efecto de la auxina sobre plantas transformadas de tabaco (Boerjan y col., 1992), o la medición de formación de raíces adventicias en cultivos *in vitro* de explantes foliares de tabaco (Gyulai y col., 1995).

Por otro lado, las técnicas colorimétricas e instrumentales se basan en las características fisicoquímicas del compuesto químico. Uno de los métodos colorimétricos más utilizados para la detección y análisis del AIA (y de otros compuestos indólicos) es el de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995; Gordon y Weber, 1951). Se ha utilizado durante años en vista de que es simple, rápido y barato, lo que permite el análisis diario de numerosas muestras. Recientemente se

determinó que el reactivo es específico para AIA, ácido indol-3-pirúvico (AIPir) y para indol-3-acetamida (Iam) (Glickmann y Dessaux, 1995). Además, el reactivo de Salkowski ha sido modificado para la detección de muchos otros compuestos indólicos analizados por cromatografía de capa fina (Ehmann, 1977).

También existen técnicas instrumentales mucho más sensibles, específicas, lentas y caras para el análisis del AIA y compuestos relacionados tales como la espectrofluorometría (Mousedale y col., 1978), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS; McDougall y Hillman, 1978), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Yamada y col., 1990a), así como la técnica de dilución isotópica estable acoplada a GC-MS (Normanly y col., 1995).

#### **2.1.4. Biosíntesis y metabolismo del AIA**

Las pequeñas cantidades de AIA presentes en los tejidos de las plantas han dificultado la identificación química y estimación cuantitativa de este compuesto. La mayoría de los trabajos que han determinado la presencia del AIA han usado métodos clásicos de análisis, tales como extracción con solventes orgánicos, fraccionamiento con éter, cromatografía y bioensayos; con estos métodos el AIA se ha reportado en gran número de plantas (maíz, trigo, papa, pepino y tomate, entre otras) (Schneider y Wightman, 1974).

La Figura 1 muestra algunas de las rutas que se han propuesto para la biosíntesis de AIA a partir del triptofano en plantas, bacterias y hongos. Desde los años 30s, se ha sabido que la estructura química del AIA es un indol 3-sustituido, igual que el triptofano (Trp). Es por eso que desde entonces, la teoría prevaleciente ha sido que el AIA se origina del Trp. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que no existe evidencia convincente al respecto, por lo que la ruta biosintética para el AIA en plantas aún estaría por definirse (Normanly y col., 1995).

El aislamiento de mutantes deficientes en la síntesis de AIA en bacterias ha apoyado la existencia de más de una ruta para producir AIA y éstas generalmente se clasifican en términos de sus intermediarios (Patten y Glick, 1996). Sin embargo, no todas las vías presentes en plantas se encuentran en bacterias, mientras que algunas parecen estar presentes solamente en éstas.

A comparación de las plantas y bacterias, la síntesis de AIA en hongos ha sido poco estudiada; existen relativamente pocos trabajos publicados al respecto. Ek y col. (1983) desarrollaron un método de GC-MS para determinar la producción de AIA en hongos formadores de micorrizas y encontraron diferencias en la producción de AIA excretado al medio por 16 hongos. Tomita y col. (1987)

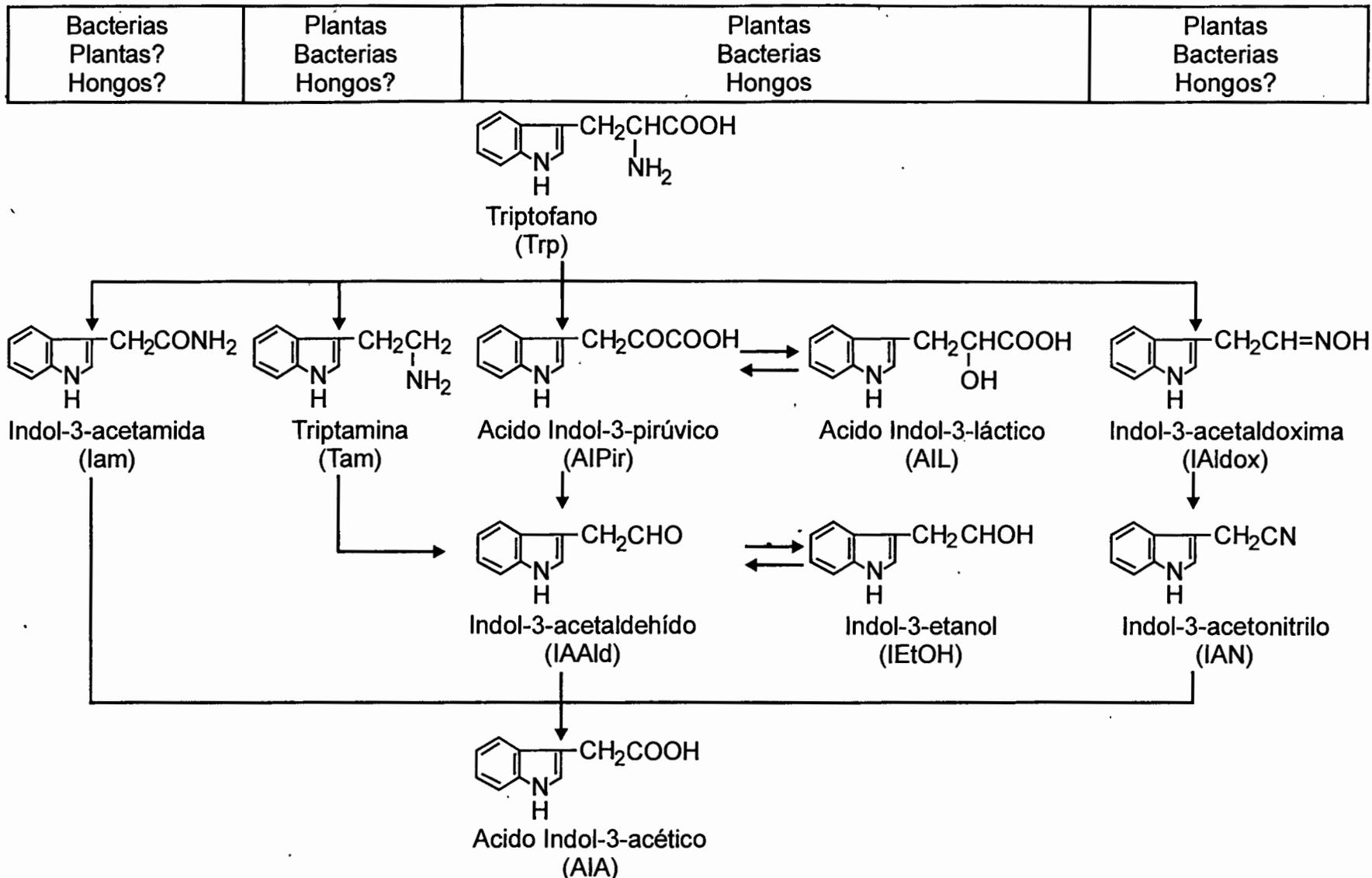


Figura 1. Rutas propuestas para la biosíntesis de ácido indol-3-acético a partir de triptofano en plantas, bacterias y hongos. Adaptada de Bartel (1997), Minamisawa y col. (1996), Normanly y col. (1995), Gaudin y col. (1994), Nonhebel y col. (1993), Koga y col. (1991), Manulis y col. (1991), Yamada y col. (1991), Sembdner y col. (1981), Schneider y Wightman (1974).

estudiaron el efecto del AIA endógeno en la germinación de esporas de *Neurospora crassa* y la presencia de esta auxina en el medio de cultivo y en el micelio; además identificaron el AIA por GC-MS. En 1992, Durand y col. reportaron la presencia de AIA y otros compuestos indólicos en cultivos del hongo ectomicorrízico *Hebeloma cylindrosporum*. Hasta ahora, existe poca información acerca de los intermediarios, enzimas y genes que constituyen las rutas biosintéticas del AIA en hongos en general.

#### **2.1.4.1. Vías del triptofano**

El triptofano (Trp) es muy semejante al AIA en su estructura química, por lo que se ha considerado el precursor más probable de esta auxina. Experimentos *in vivo* del metabolismo en plantas han demostrado que el <sup>14</sup>C-Trp puede ser convertido a <sup>14</sup>C-AIA por diversos tejidos de las plantas (Schneider y Wightman, 1974).

En relación al posible papel del triptofano (Trp) como precursor del AIA, se han publicado un buen número de estudios orientados a conocer los intermediarios, resultando varias vías principales de biosíntesis del AIA. Estas vías son la de la indol-3-acetamida (Iam), la vía de la triptamina (Tam), la vía del ácido indol-3-pirúvico (AIPir), vía del triptofol (Tol) o indol-3-etanol (IEtOH), y la vía del indol-3-acetonitrilo (IAN)(Figura 1) (Bartel, 1997; Normanly y col., 1995; Gaudin y col., 1994; Nonhebel y col., 1993; Sembdner y col., 1981; Schneider y Wightman, 1974). La evidencia para la existencia de estas vías está basada en la presencia de compuestos intermediarios, la conversión *in vivo* de los intermediarios, así como el aislamiento de algunas enzimas que catalizan las reacciones en las vías antes mencionadas. Las rutas se describen brevemente a continuación.

##### **2.1.4.1.1. Vía de la indol-3-acetamida (Iam)**

Esta ruta no es importante en plantas, aunque se ha reportado en plántulas de calabaza (Rajagopal y col., 1994). Sin embargo, se han reportado una gran cantidad de bacterias del suelo que producen AIA por esta ruta, entre las que destacan miembros del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azospirillum*, las cuales son bacterias que ayudan a fijar nitrógeno (Patten y Glick, 1996).

Un número considerable de bacterias fitopatógenicas son también capaces de producir AIA por esta vía. Entre éstas, los géneros más estudiados son *Agrobacterium*, que causa la agalla de la corona (Figura 2A) en un gran número de dicotiledóneas (Dixon, 1984) y *Pseudomonas*, que ocasiona tumores y lesiones

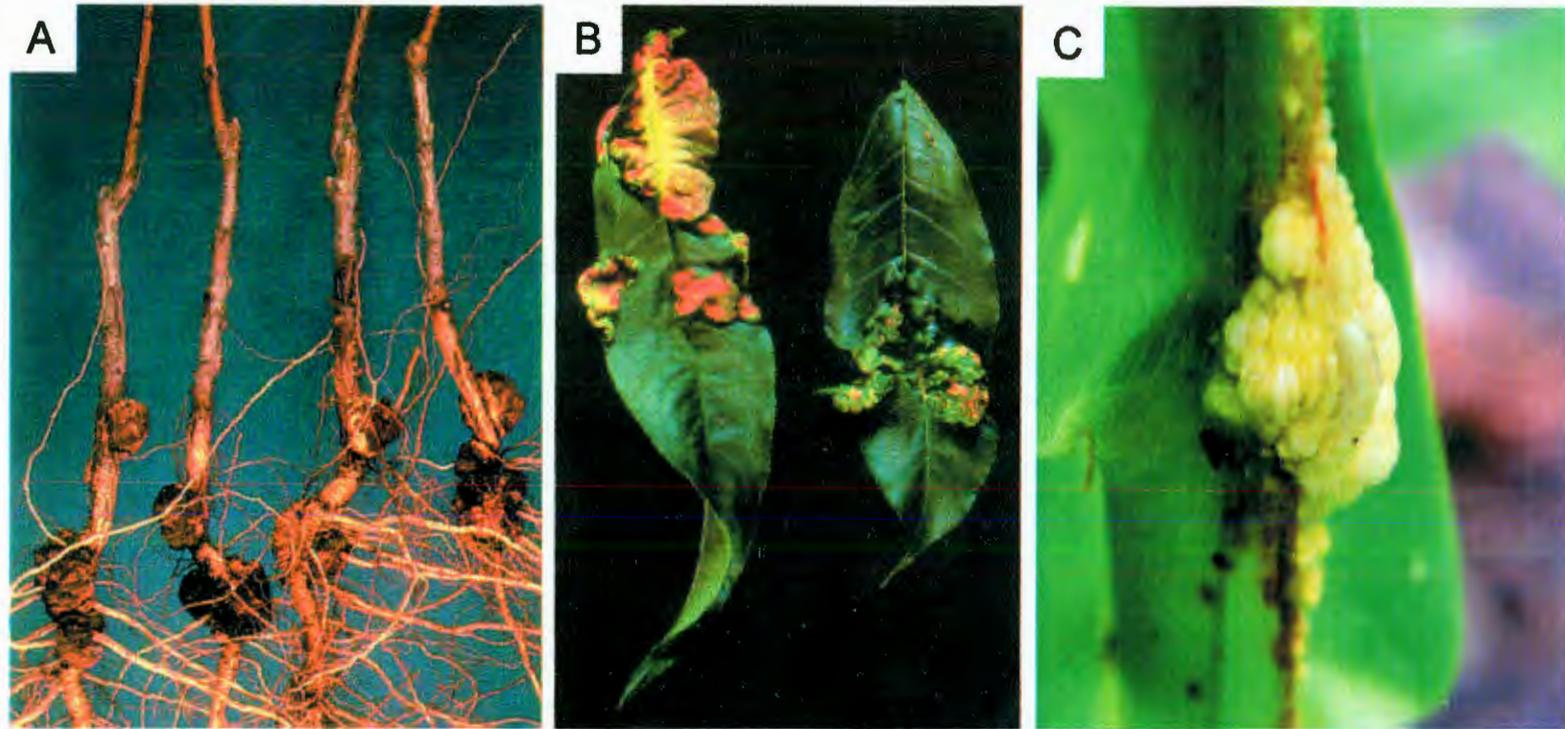


Figura 2. Ejemplos de enfermedades que involucran formación de tumores por microorganismos patogénicos de plantas. A) Agalla de la corona en plántulas de durazno causada por *Agrobacterium tumefaciens*, B) Enrollamiento de la hoja del durazno ocasionado por *Taphrina deformans*, C) Agallas del carbón común inducidas por *Ustilago maydis* en hojas de maíz. Fotografías A y B tomadas de Ogawa y col. (1995).

(nudos) en el olivo, la adelfa y el fresno (Mazzola y White, 1994; Surico y Iacobellis, 1992).

La ruta de la lam de bacterias fitopatogénicas es tal vez la mejor caracterizada. En ellas, el AIA se sintetiza a partir del Trp teniendo como único intermediario a la indol-3-acetamida (lam; Figura 1). Se ha visto que solo hay dos enzimas, y genes que las codifican, involucrados en dicha ruta en las especies estudiadas. La primera enzima es la Trp monooxigenasa, que convierte al Trp en lam, y la segunda es la lam hidrolasa, que genera al AIA. En *Agrobacterium tumefaciens*, la primera enzima es codificada por el gen *tms1* (llamado *aux1* en *A. rhizogenes*), mientras que la segunda es codificada por el gen *tms2* (*aux2*) (Gaudin y col., 1994).

Kuo y Kosuge (1969) establecieron que la biosíntesis del AIA en *P. syringae* pv. *savastanoi* ocurre principalmente por esta vía; además, la producción del AIA es constitutiva, independientemente del medio en que la bacteria fue cultivada (sin Trp) y en ausencia del huésped. En esta bacteria se han identificado los genes *iaaM* e *iaaH*, los cuales codifican para la Trp-2-monooxigenasa y la lam hidrolasa, respectivamente. Los genes correspondientes también han sido clonados a partir de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, causante de la enfermedad de manchas cafés en frijol (Mazzola y White, 1994).

#### 2.1.4.1.2. Vía de la triptamina

En esta vía (Figura 1) el primer paso involucra la descarboxilación de Trp a triptamina (Tam) por la triptofano descarboxilasa, la cual es altamente específica para el Trp como sustrato. El gen que codifica esta enzima ha sido aislado de *Catharanthus roseus* (Nonhebel y col., 1993) y la Tam ha sido identificada en tomate por GC-MS (Cooney y Nonhebel, 1991). La oxidación de Tam a indol-3-acetaldehído (IAAld) es catalizada por amino oxidasas no específicas.

Poco se conoce acerca de la presencia de esta ruta en bacterias, sin embargo se ha reportado que *Bacillus cereus* sintetiza una descarboxilasa que puede actuar sobre el Trp para producir Tam (Patten y Glick, 1996). De la misma forma, se ha visto que *A. brasilense* convierte Tam a AIA (Hartmann y col., 1983).

#### 2.1.4.1.3. Vía del ácido indol-3-pirúvico

El ácido indol-3-pirúvico (AIPir) y el indol-3-acetaldehído (IAAld) son compuestos inestables y el AIA es uno de los productos que resultan de su rompimiento químico durante su extracción y análisis cromatográfico (Sembdner y

col., 1981); por esta razón se ha dificultado mucho el estudio de la actividad biológica de ambos intermediarios participantes en esta ruta. El primer paso en la vía del AIPir (Figura 1) involucra la transaminación de Trp para producir AIPir; esta reacción es catalizada por una aminotransferasa multiespecífica que puede utilizar tanto Trp como tirosina, fenilalanina y aminoácidos no aromáticos como donadores del grupo amino (Nonhebel y col., 1993; Cooney y Nonhebel, 1991). La segunda enzima que interviene en esta ruta es la AIPir-d Descarboxilasa. Nonhebel y col. (1993) y Cooney y Nonhebel (1991) establecieron mediante análisis de dilución de isótopos que el AIPir está presente de manera natural en la planta de tomate. Los genes que codifican para esta enzima han sido aislados de las bacterias *Enterobacter cloacae* (Koga y col., 1991) y *Azospirillum brasilense* (Costacurta y col., 1994), sin embargo ninguno de esos genes ha sido clonado de plantas. Se ha aislado de pepino y tabaco la enzima IAAId-oxidasa requerida en el siguiente paso de la ruta. También, Koshiya y Matsuyama (1993) encontraron un complejo enzimático de la IAAId-oxidasa que forma AIA a partir de Trp en la punta del coleóptilo del maíz.

La ruta del AIPir no es predominante en bacterias. Sin embargo, Costacurta y col. (1994) aislaron de *Azospirillum brasilense* el gen de la enzima indol-3-piruvato Descarboxilasa (*ipdC*), la cual es clave en esta ruta. Por otra parte, *Enterobacter cloacae* acelera el crecimiento de varias plantas; se ha sugerido que esto es debido a la producción de AIA por esta vía (Koga y col., 1991).

Manulis y col. (1991) encontraron que las cepas no patogénicas de *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* producen AIA por la vía del AIPir, a diferencia de las patogénicas que usan la vía de la lam. El gen *ipdC* de *E. herbicola* fue aislado por Brandl y col. (1996); la secuencia de aminoácidos del producto de este gen es muy similar al *ipdC* de *Enterobacter cloacae*.

Entre los hongos fitopatógenicos que producen tumores o deformaciones en tejidos vegetales se encuentran los ascomicetos *Taphrina wiesneri* y *T. deformans*, los cuales causan la escoba de bruja del cerezo y el enrollamiento de la hoja del durazno (Figura 2B), respectivamente (Yamada y col., 1990a, b). Uno de los hongos más estudiados respecto a la síntesis de AIA es *Taphrina deformans*; Perley y Stowe (1966) identificaron por cromatografía en capa fina el AIPir, ácido indol-3-láctico (AIL), IEtOH y AIA como metabolitos intermediarios provenientes del Trp en extractos del medio de cultivo. Yamada y col. (1990a) reportaron que el AIA es producido por *T. deformans* a partir del Trp teniendo como intermediarios al AIPir e IAAId (Figura 1). Además, realizando experimentos con

intermediarios del AIA sugirieron que se sintetiza más AIA cuando el precursor es IAN y no Trp. Midiendo la actividad de la nitrilasa (que transforma IAN en AIA) encontraron que es una enzima inducida por el substrato, mientras que la aminotransferasa (que genera AIPir a partir de triptofano) es expresada de manera constitutiva.

Adicionalmente, Yamada y col. (1990b) reportaron que la resistencia al ácido clofibrico (ACF) fue una estrategia útil para el aislamiento de mutantes de *Taphrina wiesneri* y *T. deformans* con producción disminuida de AIA. El ACF es un análogo sintético e inactivo de auxina, el cual inhibe competitivamente la actividad de las auxinas activas (Wareing y Phillips, 1981; Moore, 1979); aunque sus propiedades mutagénicas no han sido explicadas. Las mutantes obtenidas resultaron ser deficientes en la biosíntesis de purinas, y exhibieron morfologías celulares atípicas, incluyendo un tamaño conidial menor. También mostraron que la mutagénesis con ACF ocasionó rupturas y rearreglos en los cromosomas de las cepas tratadas. Además, las mutantes acumularon grandes cantidades de IEtOH en lugar de AIA con lo que se confirmó que la ruta de síntesis del AIA procede vía AIPir.

El género *Ustilago* incluye varias especies que producen enfermedades caracterizadas por formación de tumores/agallas y/o deformación de tejidos vegetales. Entre ellas se encuentran *U. maydis*, agente causal del carbón común del maíz (Figura 2C) (Valverde y col., 1995), y *U. scitaminea*, que causa el carbón de la caña de azúcar (Alexander y Padmanaban, 1992). En *Ustilago maydis* la ruta biosintética de producción de AIA ha sido poco estudiada; se ha sugerido que la ruta tiene al Trp como precursor e involucra al AIPir y al IAAld como intermediarios (Basse y col., 1996; Basse y Kahmann, 1994; Navarre, 1990; Wolf, 1952). Esta y otra información pertinente a la producción de AIA y la inducción de tumores por *U. maydis* se presenta en mayor detalle en secciones posteriores.

#### 2.1.4.1.4. Vía del triptofol (indol-3-etanol)

La conversión reversible de IAAld a IEtOH (Figura 1) se ha sugerido como uno de los mecanismos para regular la síntesis del AIA, ya que se ha demostrado una correlación inversa entre los niveles de AIA e IEtOH durante la germinación y desarrollo de semillas de *Pinus sylvestris*, sugiriendo que el IEtOH actúa como una forma de almacenamiento de AIA. Asimismo, se ha visto que IEtOH es un constituyente natural de los tallos de girasol y tomate (Sembdner y col., 1981; Schneider y Wightman, 1974). Se ha demostrado que la reducción de IAAld y la

oxidación de IEtOH son catalizadas por las enzimas IAld reductasa e IEtOH oxidasa, respectivamente, que han sido purificadas a partir de pepino (Nonhebel y col., 1993).

Recientemente, Furukawa y col. (1996) reportaron que el hongo fitopatogénico *Rhizoctonia solani* Kühn produce AIA a partir del Trp de manera eficiente, además de IEtOH el cual se asume es un subproducto específico de la vía del AIPir.

#### 2.1.4.1.5. Vía del indol-3-acetonitrilo

En esta ruta el Trp es convertido a indol-3-acetaldoxima (IAldox; Figura 1) y posteriormente a indol-3-acetonitrilo (IAN); todo este proceso es llevado a cabo por un sistema enzimático unido a la membrana plasmática (Ludwig-Müller y col., 1993; Ludwig-Müller y Hilgenberg, 1990). El siguiente paso es llevado a cabo por las nitrilasas que convierten el IAN a AIA (Bartel y Fink, 1994; Bartling y col., 1994). Las nitrilasas han sido clonadas a partir de *A. thaliana*, considerándose como las enzimas claves en la biosíntesis del AIA para esta ruta; sin embargo se cree que existe más de una vía en esta planta ya que estas enzimas son expresadas diferencialmente durante el desarrollo de la planta (Bartling y col., 1994).

Por otro lado, la síntesis del AIA a través de IAN en diversas familias de plantas, tales como Brassicaceae (grupo de la col y rábano), Gramineae (pastos) y Musaceae (plátano), procede vía indol-3-glucosinolatos (Kobayashi y col., 1993). Además, el IAN también puede derivar del precursor antranilato sin tener al Trp como intermediario (Bartling y col., 1994; Normanly y col., 1993).

El hongo *Plasmodiophora brassicae* es un patógeno intracelular que ocasiona la llamada hernia de las crucíferas, enfermedad caracterizada por producción exagerada de raíces deformes (Dixon, 1984). En este sistema, Rausch y col. (1983) demostraron la síntesis de AIA por una ruta que involucra al IAN. Además, observaron que las plantas infectadas presentan niveles anormales de indol-3-metilglucosinolato el cual es rápidamente hidrolizado a IAN, concluyéndose que la infección por este hongo cambia el metabolismo de los compuestos indólicos, conduciendo a una ruta específica de síntesis la cual no está presente en tejidos sanos de la planta.

Más recientemente, el reporte de Ludwig-Müller y col. (1993) confirmó que el IAN se halla involucrado en la sobreproducción de AIA en coles infectadas por *P. brassicae*, y que ocurren cambios en el metabolismo de las auxinas que no son causados directamente por el hongo, mientras que se han encontrado citocininas

que son sintetizadas en los plasmodios del hongo.

#### **2.1.4.2. Vías independientes del triptofano**

Estudios recientes en plantas auxótrofas para Trp han hecho posible concebir de otra manera la síntesis del AIA. Con mutantes Trp<sup>-</sup> del maíz (Rekoslavskaya y Bandurski, 1994; Wright y col., 1991) y *A. thaliana* (Normanly y col., 1993), así como en *Lemna gibba* (Baldi y col., 1991) se ha demostrado que la síntesis del AIA puede ocurrir sin utilización de Trp (Figura 3), sugiriéndose que la biosíntesis puede ser por la vía del indol o del indolglicerol fosfato (Bartel, 1997; Normanly y col., 1995).

Prinsen y col. (1993), trabajando con precursores marcados, pusieron en evidencia múltiples rutas de síntesis del AIA en *A. brasilense*. Adicionando <sup>3</sup>H-Trp al medio de cultivo, demostraron que solo el 10% del AIA producido por la bacteria proviene de una vía dependiente del Trp y sin tener como intermediario a la lam, deduciendo que el 90% de la síntesis del AIA ocurre de manera independiente del precursor Trp por otra ruta no conocida todavía

#### **2.1.4.3. Conjugación del AIA**

El control de la concentración relativa de una cierta fitohormona en un ambiente celular y estadio de desarrollo dados es una de las condiciones que determinan su actividad biológica. Dicha concentración puede ser afectada por su síntesis *de novo*, por su degradación, o a través de su conjugación con otros metabolitos. En relación a las rutas biosintéticas y degradativas, se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos de conjugación de los reguladores de crecimiento con otros compuestos (Kleczkowski y Schell, 1995). Se ha reportado que, en las plantas superiores, el 98% del AIA se encuentra en forma conjugada (Jensen y Bandurski, 1994). Los conjugados del AIA son predominantemente de tipo éster (con glucosa y mio-inositol) y de tipo amida (con aminoácidos). Los ésteres son más comunes en las plantas monocotiledóneas mientras que las amidas predominan en las dicotiledóneas. El AIA también forma conjugados con compuestos de alto peso molecular, tales como el AIA-glucano (7 a 50 unidades de glucosa por AIA) y la AIA-glicoproteína, ambos encontrados en semillas de cereales (Cohen y Bandurski, 1982).

La síntesis de conjugados de AIA ocurre en su mayor parte durante la formación de las semillas. Los conjugados en general sirven como fuente de auxinas durante la germinación, como protección contra la oxidación, como forma

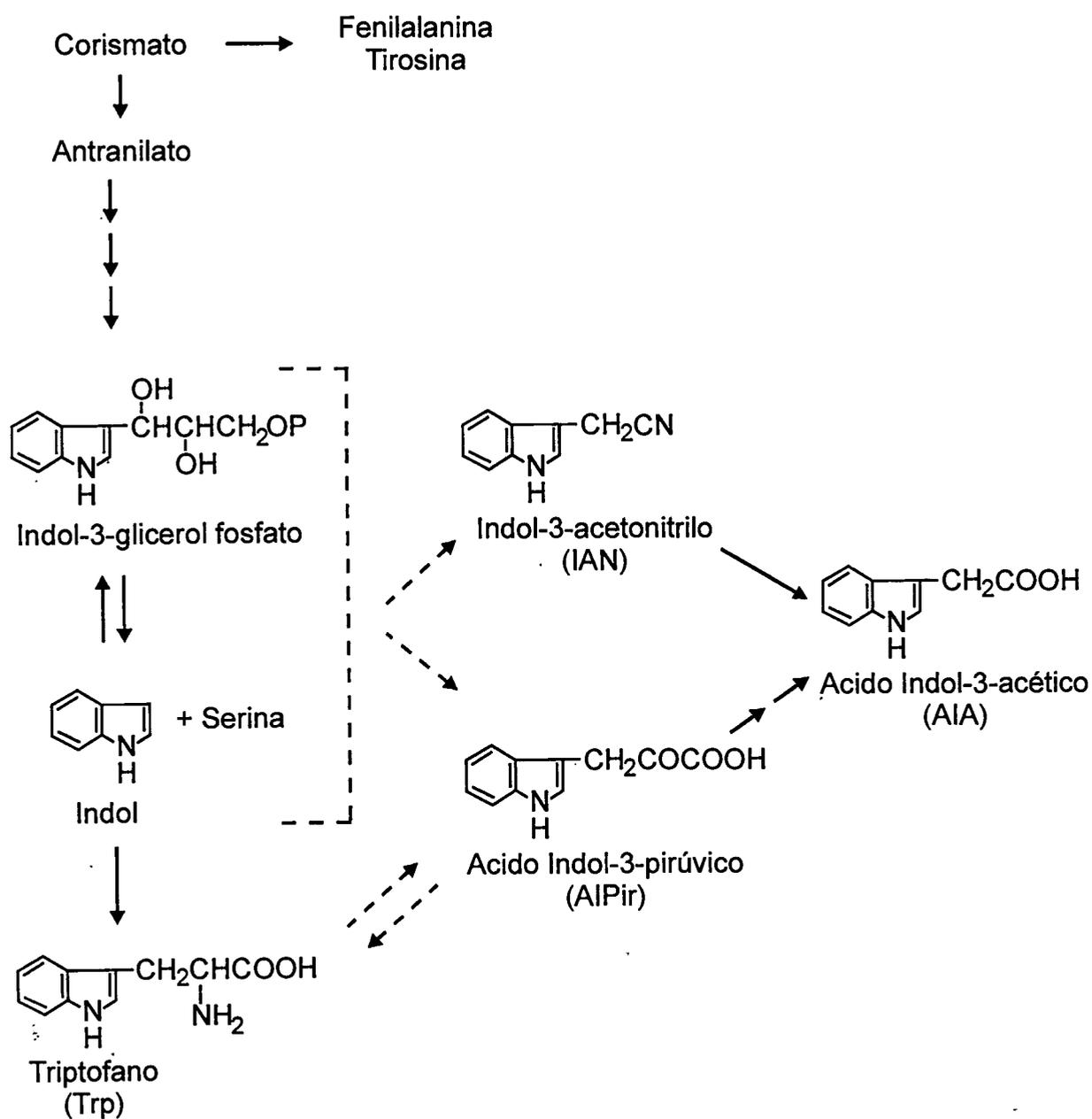


Figura 3. Posibles rutas independientes del triptofano (Trp) para la biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) en plantas. Adaptada de Bartel (1997) y Normanly y col. (1995).

de transporte y como reguladores de la concentración de auxinas (Jensen y Bandurski, 1994). Las actividades de los conjugados difieren dependiendo del compuesto ligado (Hangarter y col., 1981); por ejemplo, los conjugados con los aminoácidos L-fenilalanina L-histidina y L-arginina y los conjugados con los D-aminoácidos, no promueven el crecimiento de coleóptilos de avena, mientras que otros como los de L-glicina, L-leucina, L-serina, L-prolina y L-treonina mostraron mejor respuesta que el AIA libre a una concentración de  $10^{-6}$  M en coleóptilos de avena (Chao-Shieung y col., 1977). La capacidad de actividad de auxina de los conjugados está relacionada con la capacidad de hidrólisis del conjugado en el tejido vegetal particular (Bialek y col., 1983; Hangarter y col., 1981).

Gran parte de los estudios sobre conjugados de AIA se han hecho en semillas de maíz (Cohen y Bandurski, 1982). De hecho se ha encontrado de manera general, mayor concentración de conjugados en semillas que en otros tejidos vegetales en maíz, avena y gramíneas (Cohen y Bandurski, 1982). Los conjugados de AIA presentes en semillas de maíz son AIA-glucano (52.5% del total), AIA-inositol-arabinósidos (23.2%), AIA-inositol (15.2 %), 5-O-L-galactopiranosil-2-O-indol-3-acetil-*mio*-inositol (8.1%), otros ésteres con inositol y D-glucopiranososa (0.3%), mientras que el 0.8% del total del AIA se encuentra en forma libre (Cohen y Bandurski, 1982). No se han reportado conjugados con aminoácidos en maíz. Tampoco se ha observado la oxidación de los conjugados de AIA con aspartato, glicina y alanina en presencia de peroxidasa extraídas de maíz. Se ha demostrado también que proteasas y esterases comerciales no pueden hidrolizar los conjugados con aminoácidos (Bandurski y col., 1995; Cohen y Bandurski, 1982). Estos reportes sugieren que cada conjugado es hidrolizado por enzimas específicas presentes en los tejidos vegetales. La imposibilidad de un tejido de hidrolizar a un conjugado de AIA, resulta en una nula actividad de auxina del conjugado.

Por otro lado, se ha visto que en *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, el metabolismo del AIA también involucra su conjugación con el aminoácido lisina, reacción llevada a cabo por la enzima indol-3-acetil-lisina sintetasa, codificada por el gen *iaaL* (Romano y col., 1991).

### **2.1.5. Papel de las auxinas en interacciones planta-microorganismo**

Los reguladores de crecimiento actúan en bajas concentraciones y una ligera desviación de la concentración normal puede acarrear patrones de crecimiento anormales. Las concentraciones en la planta no son constantes sino

que se sintetizan dependiendo de los requerimientos de la planta (Davies, 1995). Los microorganismos que viven en asociación con las plantas (simbiontes o patógenos) han desarrollado la capacidad de alterar los procesos fisiológicos de éstas para su propio beneficio; por ejemplo los microorganismos patogénicos utilizan a los reguladores de crecimiento para alterar las condiciones fisiológicas en el huésped, ya sea sintetizando nuevos o diferentes compuestos que conducen a cambios morfológicos en la planta (Yamada, 1993). Esto se ha demostrado de manera convincente en algunos casos (*A. tumefaciens* y *P. syringae* pv. *savastanoi*), aunque también las respuestas de la planta por el aumento de la formación de fitohormonas podrían tener un papel decisivo (Schröder, 1987).

### **2.1.5.1. Simbiosis**

El resultado de la interacción entre plantas y microorganismos, con respecto al AIA, depende de la cantidad de auxina disponible en la planta. En las asociaciones simbióticas, los microorganismos pueden vivir fuera de la planta huésped (a excepción de los hongos micorrízicos), colonizando su superficie en la rizósfera o filósfera y excretando AIA, lo cual ejerce un efecto predominante que resulta en la inducción del crecimiento de los tejidos de la planta (Patten y Glick, 1996). Existe evidencia acerca del posible mecanismo por el cual las rizobacterias estimulan el crecimiento de la planta. Barbieri y col. (1986) encontraron que la inoculación de plántulas de trigo con *A. brasilense* incrementa el número y longitud de las raíces laterales. En experimentos similares con *A. brasilense* Sp7 se formó AIA y se estimuló la formación de raíces laterales y aéreas de pastos (Zimmer y col., 1988). Tratando de conocer acerca de la relación planta-bacteria, Omay y col. (1993) adicionaron savia de raíz de trigo al medio de cultivo de *A. brasilense* Cd y encontraron que no hay incremento de AIA, sugiriendo que el Trp de la rizósfera no está disponible en cantidades que puedan influir en la producción de AIA por bacterias del suelo. Por otro lado, la inoculación de trigo con la mutante de *A. brasilense* SpM7918, la cual produce solo 2-5% de AIA con respecto de la cepa silvestre, resultó en una pobre capacidad para promover el crecimiento de la raíz comparada con la de la cepa silvestre Sp6 (Costacurta y Vanderleyden, 1995).

Ernstsen y col. (1987) sugirieron que la síntesis de AIA podría ser necesaria en los procesos de nodulación de la raíz inducidos por especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, sin embargo en ese tiempo se desconocía si los bacteroides presentes en los nódulos sintetizaban AIA. Por otro lado, Hunter en 1989 trabajando con clones de *B. japonicum* (sobreproductoras e hipoproductoras

de AIA) demostró que los bacteroides de los nódulos pueden producir AIA y que aquellos nódulos que contienen niveles altos de AIA presentan bacteroides hiperproductores de AIA; tal evidencia sugiere que el AIA presente en el nódulo es producido por la bacteria. Esto puede tener implicaciones fisiológicas importantes para esta relación simbiótica; si se aumentan los nódulos se incrementa la masa y, por lo tanto, la cantidad de nitrógeno fijado. Prinsen y col. (1991) encontraron que los flavonoides exudados de la raíz de alfalfa y adicionados al medio de cultivo de *R. meliloti* incrementan la síntesis de AIA, sugiriendo que los flavonoides no activan únicamente la expresión de los genes *nod*, (que dan como resultado el incremento de la organogénesis en la planta) sino que también causan un incremento considerable en la producción de AIA.

Recientemente se ha confirmado que el número de nódulos en raíces de soya colonizadas por *B. elkanii* se compara con la producción de AIA *in vitro*. La inoculación con mutantes deficientes en AIA reduce significativamente el número de nódulos con respecto a la cepa silvestre y la adición de AIA restablece el número de nódulos originales; además, la estructura del nódulo es diferente entre la cepa que es AIA<sup>+</sup> o AIA<sup>-</sup>. Estos resultados manifiestan que la producción de AIA por *B. elkanii* está involucrada en la formación del nódulo en la soya (Fukuhara y col., 1994).

Uno de los mecanismos más conocidos para explicar el efecto del crecimiento de la planta por microorganismos asociados a ella es la producción de AIA, el cual estimula el crecimiento celular, la división celular y la diferenciación. Cuando las plantas son tratadas con microorganismos productores de AIA, el efecto sobre las mismas dependerá de la cantidad sintetizada, variando la respuesta de una especie a otra; además, estos microorganismos alteran el balance hormonal dentro de la planta. Se ha observado que algunos hongos micorrícicos (*Hebeloma hiemale*, *Pisolithus tinctorius*) estimulan el crecimiento de la raíz cuando hay Trp presente, manifestando que estos hongos metabolizan Trp a AIA y pueden ser utilizados para estimular la formación de raíces *in vitro* en plantas micropropagadas (Arshad y Frankenberger, 1991; Gay, 1990). En contraste, Danneberg y col. (1992) observaron que el contenido de AIA, determinado por bioensayo, es el mismo en raíces de maíz infectadas y no infectadas por el hongo *Glomus* sp.

#### **2.1.5.2. Interacciones con bacterias fitopatogénicas**

Es bien conocido que los reguladores de crecimiento producidos por

patógenos de plantas pueden estar íntimamente relacionados en procesos de enfermedad. De hecho, dichos reguladores han sido considerados como importantes en la etiología de las anomalías del crecimiento producidas en algunas enfermedades en plantas. Las auxinas y las citocininas están frecuentemente involucradas en el desarrollo de algunos síntomas, principalmente en la hiperplasia y la hipertrofia (Surico y col., 1985).

La relación entre producción de reguladores de crecimiento y tumores fue observada cuando tejidos de la agalla de la corona del tabaco, libre de bacterias, pudieron crecer en cultivo sin la adición de AIA; generalmente el tejido de callo de tabaco normal crece solamente en cultivos adicionados de AIA (Roberto y Kosuge, 1987). En años recientes se ha confirmado que la formación de tumores está asociada con la presencia del plásmido llamado Ti de *A. tumefaciens*. Durante el proceso de infección, esta bacteria tiene la capacidad de transferir una porción específica del plásmido Ti, la región T-DNA, hacia el interior de las células de plantas dicotiledóneas, donde es incorporado al genoma del huésped. Dicha región contiene genes que codifican enzimas para la síntesis de AIA. Estos genes (*tms-1* y *tms-2*) están adaptados para expresarse dentro de la planta. Además poseen secuencias regulatorias similares a las señales de expresión de los eucariotes (cajas TATA, CAAT y señales de poliadenilación) (Patten y Glick, 1996; Costacurta y Vanderleyden, 1995). Por otro lado, el plásmido Ti fue mutado y se observó que la mutante presentaba síntesis reducida de AIA, lo cual además causó la pérdida de la virulencia (Liu y col., 1982).

En *A. rhizogenes*, agente causal de la enfermedad llamada raíz pilosa en plantas dicotiledóneas, los genes para la biosíntesis de AIA (*aux*) están localizados en la región T-DNA del plásmido Ri, que también se incorpora al genoma de la planta (Costacurta y Vanderleyden, 1995). Los genes *aux* son similares en secuencia a los *tms* de *A. tumefaciens*; de la misma forma las señales de regulación son semejantes (Gaudin y col., 1994). El grupo de genes llamados *rol*, localizado en la región T-DNA de *A. rhizogenes* ha sido implicado en la estimulación de la formación de raíz en plantas transformadas (Costacurta y Vanderleyden, 1995). Dichos genes *rol* confieren a la planta un fenotipo similar al observado si la planta tuviera niveles altos de AIA. Se ha propuesto que el gen *rolB* codifica para una  $\beta$ -glucosidasa que puede hidrolizar los conjugados de AIA-glucosa, dando como resultado AIA libre.

*E. herbicola* pv. *gypsophilae* produce agallas en la raíz de flores ornamentales. Cepas patogénicas y no patogénicas de esta bacteria producen AIA

por la vía del AIPir; sin embargo, solo las patogénicas lo producen por la ruta de la lam (Manulis y col., 1991). Los genes *ehgM* y *ehgH* fueron aislados de un plásmido de esta bacteria utilizando como sonda los *iaaM* e *iaaH* de *P. syringae* (Clark y col., 1993). Mutantes de *E. herbicola* con los genes *ehg* inactivados producen la misma cantidad de AIA a partir del Trp con respecto a la cepa silvestre, planteando la presencia de una vía alterna (Manulis y col., 1991). En otros patógenos de plantas, los genes que codifican para la síntesis del AIA son necesarios para la virulencia; sin embargo, se ha observado que la inactivación de estos genes no atenúa la virulencia, como se ha visto con *A. tumefaciens*, aunque físicamente el tamaño de la agalla se ve reducido (Clark y col., 1993).

*P. syringae* pv. *savastanoi*, agente causal de la enfermedad llamada nudo del olivo y de la adelfa, sintetiza gran cantidad de AIA vía lam, secretándolo en el sitio de infección y produciendo un tumor por multiplicación anormal de las células de la planta (Yamada y col., 1991; Comai y Kosuge, 1983; Kosuge y col., 1983). Los genes *iaaH* e *iaaM* están localizados en el plásmido pIAA en cepas aisladas de la adelfa, y en el cromosoma bacteriano o en un megaplásmido en aislados del olivo. Estos genes presentan homología con los de *A. tumefaciens* (Yamada y col., 1991).

Las mutantes de *P. savastanoi* deficientes en la funcionalidad de los genes *iaa* son avirulentas (no inducen tumor). La mutante hiperproductora de AIA, la cual acumula 2-3 veces más AIA que la cepa silvestre, induce grandes tumores. Sin embargo, la adición de AIA exógeno a la planta no induce tumores; por lo tanto se ha postulado que la expresión de los genes *iaa* es un determinante para la inducción del tumor (Yamada, 1993).

Resumiendo, la cantidad de AIA microbiano disponible para poder influir sobre la planta parece depender de diversos niveles de regulación del AIA por parte del microorganismo, entre los cuales se encuentran la vía de biosíntesis del AIA. Se ha considerado a la vía de la lam como característica de bacterias fitopatogénicas, en vista de que esta vía no es propia de plantas (Patten y Glick, 1996). Por otro lado, también se debe tomar en cuenta la presencia de enzimas involucradas en la hidrólisis de conjugados de AIA, ya que éstos son formas inactivas del AIA y determinan los niveles de éste (Kleczkowski y Schell, 1995). También se debe analizar la naturaleza de la interacción planta-bacteria, ya que si se transforma a la planta con los genes de la bacteria que dan lugar a la síntesis o a la conjugación de AIA, se le expone a un desbalance de AIA, provocando patrones morfológicos de crecimiento alterados (Gaudin y col., 1994). Se ha

sugerido que niveles óptimos de AIA por parte de los microorganismos realzan el crecimiento y los niveles muy altos dan origen a enfermedad; dicho de otra manera, los niveles de AIA endógeno determinan si la relación es benéfica o patogénica (Patten y Glick, 1996).

### **2.1.5.3. Interacciones con hongos fitopatógenicos**

Estudiando el papel del AIA en la patogénesis del tizón del tallo y del tizón café en el trigo, particularmente durante el establecimiento del contacto entre huésped y patógeno, Chkanikov y col. (1990) encontraron que las esporas del tizón del tallo excretan AIA en el medio del cultivo cuando germinan, mientras que las esporas del tizón café no poseen tal capacidad, hipotetizando que este hongo es incapaz de usar el AIA para establecer contacto con su hospedante. Esta hipótesis fue apoyada cuando infectaron hojas de trigo con estos hongos; las hojas infectadas con el tizón del tallo presentaron un incremento en el AIA, mientras que las infectadas con el tizón café no presentaron cambio alguno en el contenido de AIA.

En *Taphrina deformans*, agente causal del enrollamiento de la hoja del durazno, se ha confirmado la presencia de altos niveles de AIA y Trp en hojas infectadas comparado con los de hojas sanas (Sziráki y col., 1975).

Por otra parte, en el caso de *Plasmodiophora brassicae* no hay evidencia de que el hongo sintetice AIA *in vitro*, aunque se ha determinado la cantidad de AIA producida cuando infecta plántulas en medio de cultivo. El promedio de AIA en plántulas infectadas es 65% más alto que el de los controles no infectados (Ludwig-Müller y col., 1993).

Por otro lado, durante años se ha sabido que *Ustilago maydis*, causante del carbón común del maíz, es capaz de producir auxinas en cultivo *in vitro* (Navarre, 1990; Wolf, 1952; Moulton, 1942). El ácido indol-3-acético es la auxina que ha sido identificada tanto en medios gastados de cultivos líquidos como en las agallas del carbón (Wolf, 1952; Turian y Hamilton, 1960; Navarre, 1990). En vista de que el crecimiento hipertrófico, que resulta en los tumores típicos de la enfermedad en las partes aéreas de la planta, podría ser causado por la producción de AIA por el hongo, algunos estudios han intentado relacionar dicha producción con la formación de agallas (Basse y col., 1996; Turian y Hamilton, 1960; Wolf, 1952; Moulton, 1942), sin embargo, aún no se ha publicado evidencia concluyente.

Como puede apreciarse al analizar la literatura anteriormente citada, en

hongos fitopatogénicos, en contraste con las bacterias que causan enfermedades en plantas, a pesar de los esfuerzos que se han hecho por dilucidar las rutas de biosíntesis de AIA, no se ha logrado generar evidencia substancial que demuestre una relación entre la producción o inducción de AIA por los hongos y su capacidad para inducir tumores en sus huéspedes.

#### **2.1.5.4. Uso de genes de biosíntesis y metabolismo de AIA como herramientas**

La mayoría de estos genes bacterianos de biosíntesis y metabolismo de AIA han sido introducidos, mediante técnicas de transformación genética, a diversas especies de plantas (Gaudin y col., 1994). Esto se ha hecho con el fin de estudiar los procesos fisiológicos en los que participa el AIA en las plantas, induciendo una sobreproducción o un decremento en los niveles de AIA libre en los tejidos vegetales. El Cuadro 1 muestra los efectos de la transformación sobre el crecimiento y el desarrollo de las mismas. De particular interés ha resultado la introducción del gen *iaaL* de *P. savastanoi* a especies vegetales, entre las que se encuentran el tabaco (Romano y col., 1991), y la papa (Spena y col., 1991). Al colocar dicho gen bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un promotor fuerte y constitutivo, se han observado importantes cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas transformadas (Cuadro 1); tales cambios han sido atribuidos a los niveles disminuidos de auxina libre, ya que el conjugado es mucho menos activo como auxina en las plantas transformadas (Gaudin y col., 1994).

## **2.2. *Ustilago maydis* - CARBÓN COMÚN DEL MAÍZ Y HUITLACOCHÉ**

### **2.2.1. El fitopatógeno, el modelo biológico y el hongo comestible**

La enfermedad conocida como carbón común del maíz es ocasionada por el basidiomiceto *Ustilago maydis* (DC) Corda y se caracteriza por la formación de agallas (tumores) en cualquier parte aéreas de la planta. Durante muchos años, biólogos y agrónomos han encontrado en *U. maydis* un útil e interesante modelo para estudiar una amplia gama de fenómenos genéticos, fisiológicos y fitopatológicos. Además, en México, se conoce como "huitlacoche" a las agallas jóvenes que crecen sobre los elotes (mazorcas inmaduras) del maíz (Figura 4A); el huitlacoche es consumido como componente principal de un alimento o incluso como condimento (Figura 4B). El interés actual en desarrollar al huitlacoche en un producto de alto valor agregado se ha derivado de la creciente aceptación y

Cuadro 1. Rasgos fenotípicos de plantas transformadas con genes bacterianos de biosíntesis y metabolismo del ácido indol-3-acético (AIA).

Gen(es) introducido(s) a la planta	Rasgos fenotípicos
<i>tms1</i> o <i>iaaM</i>	Fenotipo normal. Formación de tumores después de infectar con cepas de <i>Agrobacterium</i> portadoras del gen <i>tms2</i> (Follin y col., 1985; Budar y col., 1986).
CaMV 19S- <i>tms1</i>	Fenotipo anormal: altos niveles de indol-3-acetamida y AIA, fuerte dominancia apical, alteración de la forma de las hojas, producción aumentada de xilema y floema, formación de raíces adventicias (Klee y col., 1987).
<i>tms2</i>	Fenotipo normal. Formación de tumores después de infectar con cepas de <i>Agrobacterium</i> portadoras del gen <i>tms1</i> (Follin y col., 1985; Budar y col., 1986).
<i>tms1</i> + <i>tms2</i> o <i>aux1</i> + <i>aux2</i>	Ligero incremento del AIA libre, fuerte aumento en los niveles de AIA conjugado (Budar y col., 1986; Camilleri y Jouanin, 1991; Sitbon y col., 1991).
CaMV 35S- <i>tms1</i> + <i>tms2</i>	Plantas con fenotipo normal o anormal: niveles elevados de AIA libre y conjugado, crecimiento reducido de tallos y hojas, floración retardada, efectos sobre formación de raíces y dominancia apical, epinastia, lignificación del xilema (Sitbon y col., 1992a y 1992b).
CaMV 35S- <i>iaaL</i>	Efectos antiauxina: niveles aumentados de AIA conjugado, enraizamiento disminuído, inhibición de diferenciación vascular, distancia internodal aumentada, epinastia de las hojas (Romano y col., 1991; Spena y col., 1991).
CaMV 19S- <i>iaaM</i>	Niveles aumentados de AIA libre, alargamiento aumentado del hipocotilo en presencia de luz, epinastia severa de hojas en roseta, dominancia apical aumentada (Romano y col., 1995).

Adaptada de Gaudin y col. (1994).

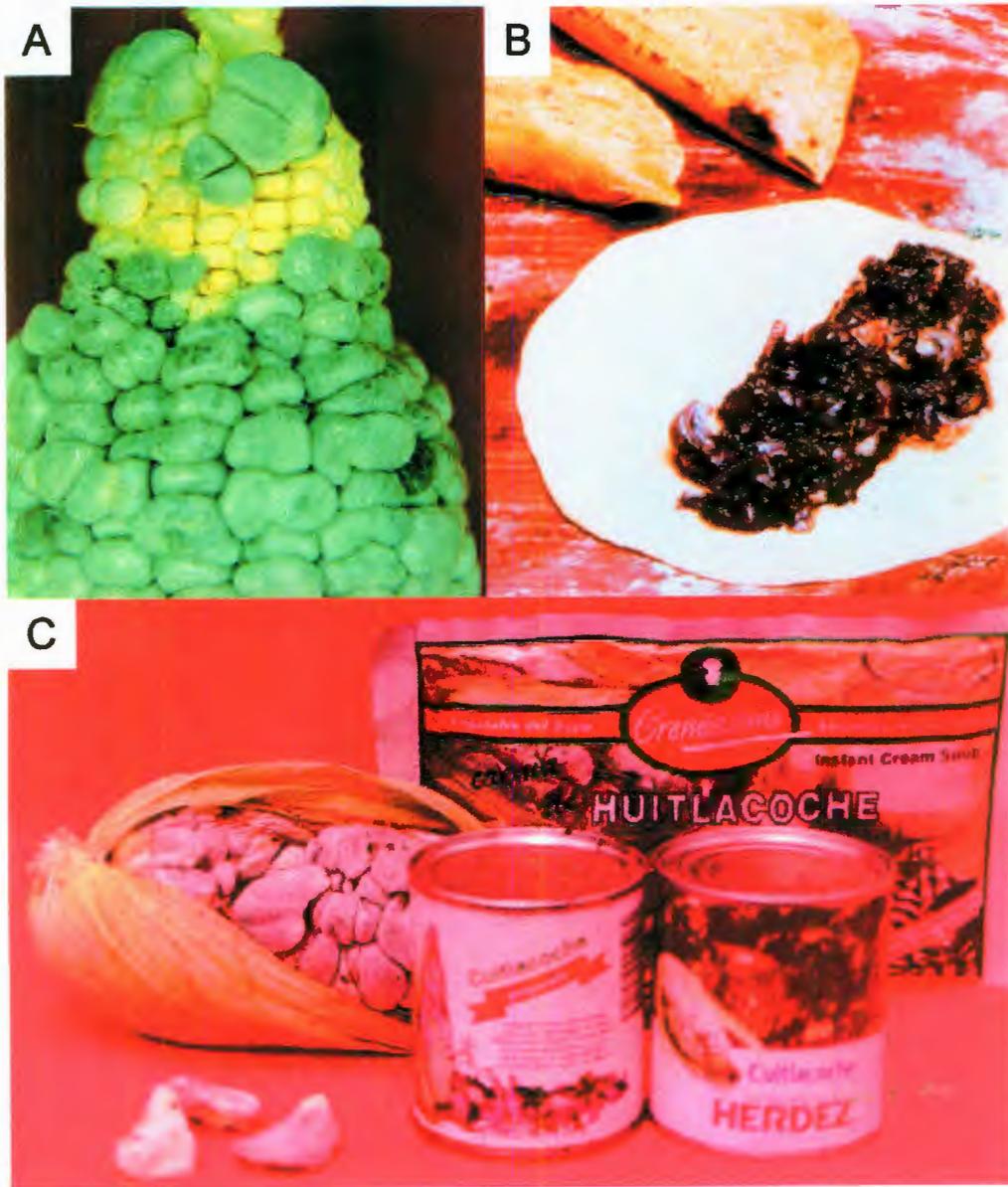


Figura 4. Huitlacoche en diversas presentaciones. A) Agallas tiernas en mazorcas inmaduras de maíz, B) Platillo típico: quesadillas de huitlacoche, C) Producto enlatado y deshidratado.

demanda del producto envasado (Figura 4C) por ciertos sectores de otros países, donde se ha empezado a considerar como un nuevo hongo comestible (Valverde y col., 1995). En años recientes se han hecho un considerable número de estudios sobre los factores que influyen sobre su calidad alimentaria, la cual ha resultado muy atractiva desde el punto de vista nutricional (Vanegas Espinoza, 1995; Vanegas y col., 1995; Valverde y col., 1993; Valverde y Paredes-López, 1993; Valverde González, 1992). Estos trabajos están sirviendo como base para la generación de tecnologías para la producción masiva de huitlacoche de alta calidad alimentaria.

### **2.2.2. Descripción del fitopatógeno y su ciclo de vida**

El carbón común del maíz se caracteriza por la formación de agallas o tumores en las partes aéreas de la planta, incluyendo tallos, hojas, espigas y mazorcas. Estas últimas pueden verse completamente cubiertas por las agallas. El hongo puede penetrar cualquier tejido joven, particularmente el meristemático, considerándose a la infección como localizada (Moore-Landecker, 1982; Alexopoulos y Mims, 1979; Christensen, 1963).

*U. maydis* presenta tres fases distintivas en su ciclo de vida (Figura 5), cada una con una condición nuclear diferente. Las basidiosporas o esporidias son células saprofitas haploides uninucleadas que se reproducen por gemación. Esta es la forma del hongo que se puede cultivar en medios sintéticos o complejos en el laboratorio (Banuett y Herskowitz, 1988). El micelio dicariótico resulta de la fusión (apareamiento o plasmogamia) de esporidias haploides compatibles. Este micelio constituye la fase parasítica del hongo que se desarrolla en el huésped [planta de maíz (*Zea mays*) y de teosinte (*Zea mexicana*)] y consiste de hifas binucleadas. Finalmente, las teliosporas son esporas de propagación y resistencia diploides que se forman después que ha ocurrido la cariogamia en las hifas del micelio dicariótico (Banuett y Herskowitz, 1996). Las agallas/tumores son de hecho masas de teliosporas junto con tejidos de la planta. Durante la germinación de las teliosporas, se lleva a cabo la meiosis mediante la cual se forman las esporidias haploides (Banuett y Herskowitz, 1996; Valverde y col., 1995; Christensen, 1963).

### **2.2.3. Mecanismos moleculares de fitopatogenicidad**

Los determinantes genéticos que gobiernan el comportamiento sexual de los basidiomicetos fitopatógenicos son comúnmente denominados loci de apareamiento o incompatibilidad, y son considerados como los principales loci de

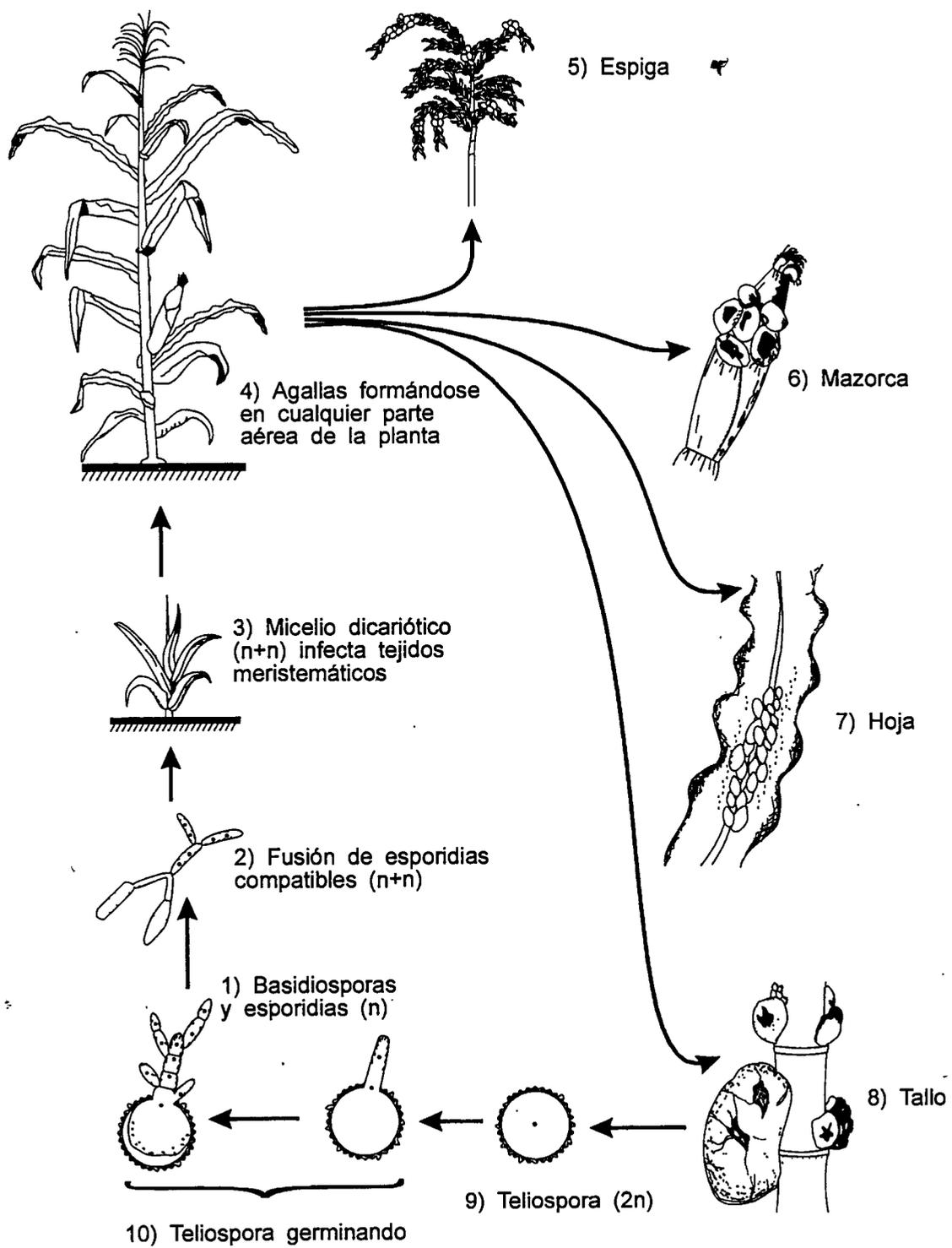


Figura 5. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.  
Adaptada de Banuett y Herskowitz (1988).

fitopatogenicidad (Kronstad, 1995). En *U. maydis*, estos rasgos son determinados por dos loci separados, llamados *a* y *b*. El locus *a* regula el apareamiento de las esporidias y tiene dos alelos (*a1* y *a2*) (Bölker y col., 1992); el locus *b* determina el comportamiento del micelio dicariótico y su capacidad de llevar a cabo la meiosis. Para el locus *b* se ha propuesto la existencia de hasta 25 alelos (Kronstad, 1995; Schulz y col., 1990). Para que se produzca el micelio dicariótico patogénico, las dos esporidias haploides deben tener diferentes alelos tanto en *a* como en *b* (por ejemplo *a1b1* más *a2b2*) (Gillissen y col., 1992; Banuett y Herskowitz, 1989). Tales cepas de esporidias se dice que son compatibles. Además, también existen algunas que son diploides y pueden infectar a la planta y producir progenie sin tener que aparearse con otra cepa. Tales cepas se llaman solopatogénicas (Christensen, 1963).

Además de los loci *a* y *b*, recientemente se han identificado algunos otros genes (*fuz1*, *fuz2* y *rff1*, entre otros) que participan en el crecimiento del micelio dicariótico y en algunos otros aspectos del ciclo de vida (Banuett, 1995).

#### **2.2.4. Versatilidad del modelo biológico**

*U. maydis* se ha utilizado en un conjunto de estudios que incluyen el control del apareamiento y la fitopatogenicidad (Banuett y Herskowitz, 1989; Kronstad y Leong, 1989), la recombinación del DNA (Kmiec y Holloman, 1986), los sistemas "killer" (Koltin, 1988) y los sideróforos (Leong y col., 1987). Además, el hongo se cultiva fácilmente en medios definidos (Holliday, 1974), es fácil de mutagenizar (Barrett y col., 1993; Unrau y Holliday, 1970), exhibe herencia mendeliana y tiene una genética relativamente caracterizada (Holliday, 1974), y existen estudios de cariotipo electroforético (Kinscherf y Leong, 1988). Además, las pruebas de infección se pueden realizar en plántulas en invernadero, completándose el ciclo de vida en solo 2-3 semanas (Barrett y col., 1993; Christensen, 1963). De gran importancia es la susceptibilidad de *U. maydis* de transformación con alta eficiencia (Tsukuda y col., 1988; Wang y col., 1988), y la posibilidad de llevar a cabo ruptura génica (Kronstad y col., 1989).

#### **2.2.5. Síntesis de ácido indol-3-acético *in vitro* y formación de agallas en planta**

Como se mencionó anteriormente, hace tiempo que se sabe que *U. maydis* es capaz de producir auxinas en cultivo *in vitro* (Navarre 1990; Wolf 1952; Moulton 1942). El ácido indol-3-acético es la auxina que ha sido identificada tanto en

medios gastados de cultivos líquidos como en las agallas del carbón (Navarre, 1990; Turian y Hamilton, 1960; Wolf, 1952). En vista de que el crecimiento hipertrófico podría ser causado por la producción de AIA por el hongo, algunos estudios han intentado relacionar dicha producción con la formación de agallas (Basse y col., 1996; Turian y Hamilton, 1960; Wolf, 1952; Moulton, 1942); sin embargo, aún no se ha publicado evidencia concluyente.

Entre los primeros trabajos al respecto, el de Moulton (1942) reportó que los tejidos del carbón del maíz contenían una auxina que mostraba actividad en bioensayos con coleóptilos de *Avena*, en niveles mucho más altos que los encontrados en tejidos no infectados de plantas de maíz.

Más tarde Wolf (1952), usando cromatografía en papel, el reactivo colorimétrico de Salkowski y otras pruebas químicas, aportó evidencia de que la auxina producida por *U. maydis* en cultivos líquidos era AIA, el cual además era sintetizado por el hongo usando L-triptofano como precursor. Entonces este investigador propuso que el AIPir y el IAAlD podrían ser intermediarios en la ruta de biosíntesis del AIA en *U. maydis*, habiendo descartado al intermediario triptamina, que forma parte de la ruta biosintética del AIA en plantas.

Años después, Turian y Hamilton (1960) confirmaron mediante técnicas químicas e isotópicas que había niveles mucho mayores de auxina en agallas jóvenes del carbón que en tejidos no infectados. Callow y Ling (1973) recalcaron la necesidad de llevar a cabo estudios críticos sobre las interrelaciones hormonales del desarrollo de los tumores del carbón del maíz, después de describir los cambios histológicos que ocurren en plántulas de maíz infectadas con esporidias de *U. maydis*.

Más recientemente, Navarre (1990) usó radiación ultravioleta o mutagénesis química con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, así como varias estrategias de selección, para aislar cepas de *U. maydis* que mostraran una producción alterada de AIA. Aunque reportó el aislamiento de varias mutantes que mostraban un fenotipo de producción disminuida de AIA, así como algunas supuestas cepas sobreproductoras del compuesto, las cepas mostraron inestabilidad (reversión) así como pobre viabilidad en medio mínimo y aún en medio completo de Holliday. Excepto por los niveles disminuidos o aumentados de AIA mostrados por dos mutantes subproductoras y dos sobreproductoras, no se publicaron análisis adicionales sobre tales cepas. Adicionalmente, él y su profesor confirmaron la identidad del AIA, analizado inicialmente con el reactivo de Salkowski en sus cepas silvestres, mediante cromatografía de capa fina y

espectrometría de masas (Navarre y Damann, 1990).

En estos trabajos, tampoco se pudo detectar homología por análisis de Southern entre el DNA genómico de *U. maydis* y los genes *iaaM* e *iaaH* de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Navarre, 1990; Navarre y Damann, 1990). Como ya se ha mencionado, estos dos genes (y sus homólogos en otras bacterias) codifican para las enzimas que sintetizan AIA a partir de Trp por la vía de la IAM en bacterias fitopatogénicas formadoras de tumores. Además, estas observaciones no fueron confirmadas mediante reportes *in extenso*, por lo que aún es necesario documentar la similitud que el DNA de *U. maydis* pudiera tener con genes de biosíntesis de AIA que hayan sido clonados y caracterizados en especies bacterianas y vegetales.

Otros experimentos importantes de Navarre (1990) y Navarre y Damann (1990) consistieron en la alimentación de células de *U. maydis* (previamente permeabilizadas con Triton X-100) con diferentes posibles precursores del AIA. Los resultados mostraron que las células pudieron convertir el AIPir a AIA, pero no pudieron transformar a la triptamina ni a la IAM. Esto les permitió sugerir que, en *U. maydis*, la síntesis de AIA se lleva a cabo a partir del triptofano y a través del AIPir y del IAAlD, lo cual coincidió con las conclusiones hechas previamente por Wolf (1952).

Más recientemente en un resumen de cartel, Basse y Kahmann (1994) reportaron la cuantificación de AIA y citocininas en *U. maydis* usando anticuerpos monoclonales en ensayos de ELISA. Estos autores no encontraron diferencias en los niveles de fitohormonas producidos por cepas haploides (no patogénicas) y diploides (patogénicas). Además, usando HPLC y detección química de derivados indólicos, se identificó al AIA y al AIPir como los principales productos del triptofano en *U. maydis*. Adicionalmente, estos autores observaron que extractos enzimáticos del hongo pueden convertir al AIPir, al IAAlD y a la IAM en AIA, por lo cual son intermediarios potenciales en la(s) ruta(s) de biosíntesis. Estos resultados concuerdan con las observaciones y sugerencias hechas por Wolf (1952) y por Navarre (1990) respecto al papel de intermediarios del AIPir y del IAAlD, aunque discrepa del reporte de Navarre (1990) en cuanto al papel de la IAM. También, mencionaron que se hacían esfuerzos para el aislamiento de cepas de *U. maydis* con producción de AIA disminuida, usando un ensayo colorimétrico para su selección.

Más tarde, Basse y col. (1996) reportaron la identificación de dos indol-3-acetaldehído (IAAlD) deshidrogenasas potenciales de *U. maydis*. De éstas

enzimas, una de ellas (llamada *lad1*) fue purificada y se determinó que cataliza la conversión (dependiente de  $\text{NAD}^+$ ) de IAAld a AIA. Utilizando esta enzima se aislaron clonas tanto de cDNA como genómicas (gen *iad1*), con las cuales se generaron mutantes nulas por reemplazo génico. Dichas mutantes mostraron una capacidad 100 veces menor de convertir el IAAld a AIA en medio con glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, las mutantes no mostraron una capacidad disminuida para sintetizar AIA a partir de Trp, lo que indica que la formación de AIA a partir de Trp procede en ausencia de actividad de IAAld deshidrogenasa. En vista de que la expresión de *lad1* fue fuertemente inducida durante el crecimiento en medio con etanol como fuente de carbono, mientras que en dicho medio las mutantes nulas *iad1* fueron incapaces de crecer, se concluyó que la enzima IAAld deshidrogenasa está principalmente involucrada en la conversión de etanol a acetato. Asimismo, las mutantes nulas *iad1* mostraron una capacidad normal de apareamiento *in vitro*, además de que la mutación no mostró efectos visibles sobre la capacidad de las mutantes de formar tumores en plántulas de maíz. Los autores concluyeron que el gen *iad1* no juega un papel crucial en el apareamiento, en la formación del micelio dicariótico, ni en la patogenicidad.

Por otro lado, la segunda actividad de IAAld deshidrogenasa (también dependiente de  $\text{NAD}^+$ ) fue detectada en las mutantes nulas *iad1*, donde fue inducida durante el crecimiento en medio con L-arabinosa pero reprimida en presencia de D-glucosa. Durante el crecimiento en L-arabinosa, la conversión de triptamina (Tam) a AIA se vio fuertemente favorecida, sugiriendo que esta segunda IAAld deshidrogenasa es necesaria para convertir IAAld derivado de Tam a AIA (Basse y col., 1996).

Más recientemente, Martínez y col. (1997) reportaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de producción de AIA *in vitro* por diversas cepas de *U. maydis*, entre las que se encontraban cepas silvestres aisladas de huitlacoche, así como silvestres de laboratorio incluyendo algunas solopatógenicas. Concurrentemente, Sosa-Morales y col. (1997) produjeron el primer reporte del aislamiento de cepas mutantes de *U. maydis* con una capacidad disminuida de producción de AIA *in vitro* a partir de Trp. Dichas mutantes fueron generadas por mutagénesis con ácido clofibrico, solo o en combinación con radiación ultravioleta, y solo fueron capaces de producir un 16-30% del nivel de AIA alcanzado por la cepa silvestre que les dio origen. En los dos trabajos mencionados anteriormente, los niveles del AIA fueron determinados mediante la técnica colorimétrica de Salkowski y corroborados mediante HPLC, mientras que la

identidad del AIA fue confirmada por cromatografía de capa fina y HPLC.

### III. JUSTIFICACIÓN

Después de analizar los trabajos anteriormente descritos, resulta obvio que aún es necesario establecer la relación que pudiera existir entre la producción de fitohormonas *in vitro* y la formación de agallas en planta por *Ustilago maydis*. Para el estudio de dicha relación se consideró posible tomar ventaja de diversas herramientas, entre las que se encuentran la factibilidad de generar mutantes del hongo que muestren defectos en su producción *in vitro* de AIA, a objeto de determinar el efecto de la(s) mutación(es) sobre la infectividad (capacidad de inducir tumores) en plantas de maíz. Por otro lado, en vista de que el gen bacteriano *iaaL* ha sido utilizado con éxito en la transformación de plantas a fin de disminuir los niveles de AIA libre y de observar los efectos consecuentes, y de que existen técnicas descritas y vectores para la transformación de *U. maydis*, se consideró posible la introducción de dicho gen a cepas de *U. maydis* para el estudio de la relación entre la producción *in vitro* de AIA y la inducción de tumores por el hongo.

En base a la carencia de información sobre este importante fitopatógeno de plantas, al potencial comercial que posee la relación *Ustilago maydis-Zea mays* para la producción masiva de un hongo comestible altamente apreciado por su exquisitez sensorial y con considerables bondades nutricionales, y a las ventajas que ofrece dicha relación y en particular *Ustilago maydis* como modelo de estudio, en el presente trabajo se propusieron los objetivos que se detallan a continuación.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Estudiar la relación entre la producción *in vitro* de ácido indol-3-acético por *Ustilago maydis* y la capacidad del hongo de inducir la formación de tumores en plantas de maíz (*Zea mays*).

### 4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Aislar cepas mutantes de *Ustilago maydis* que presenten defectos en la producción *in vitro* de ácido indol-3-acético y comparar dicha producción con la de cepas silvestres.
- 4.2.2. Construir cepas transformadas de *Ustilago maydis* que contengan el gen bacteriano *iaaL* a fin de evaluar el efecto de dicho gen sobre la producción *in vitro* de ácido indol-3-acético por las cepas, en relación a cepas testigo.
- 4.2.3. Evaluar la formación de tumores por las cepas mutantes y por las cepas transformadas de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz a objeto de determinar la relación entre la producción de AIA *in vitro* por el hongo y su capacidad de inducir tumores en planta.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. Cepas y vectores de *Ustilago maydis*

El Cuadro 2 muestra las cepas de *Ustilago maydis* que fueron utilizadas en el trabajo, así como sus fenotipos/genotipos relevantes y procedencias. Las primeras seis cepas silvestres de laboratorio enlistadas han sido y siguen siendo comúnmente utilizadas en trabajos sobre la biología molecular de *U. maydis*, realizados por diversos grupos de investigación, como lo muestran las referencias del Cuadro 2. En particular, las cepas 001 (también conocida como 518), 002 (también denominada 521), 031 y 032 son utilizadas como cepas patrón de tipo de apareamiento conocido.

Por otro lado, cabe señalar que las cepas Bx711 y Bx722 fueron obtenidas a partir de la séptima retrocruza de la cepa 001 con la 002. El proceso de retrocruzamiento se llevó a cabo de la siguiente manera: una cepa progenie F1 con tipo de apareamiento  $a2b2$ , resultante de la cruce 001 ( $a2b2$ ) x 002 ( $a1b1$ ), fue retrocruzado con la cepa 002 ( $a1b1$ ), para obtener la segunda generación (F2). De la F2 se aisló nuevamente una cepa progenie  $a2b2$ , la cual fue retrocruzada nuevamente con la cepa 002 para obtener la progenie F3. De la misma manera se hicieron las retrocruzas adicionales hasta llegar a la generación F8, resultante de la séptima retrocruza. En este punto se consideró que las cepas progenie, entre las que se encuentran Bx711 y Bx722 (Cuadro 2) son genéticamente muy similares a la cepa 002, es decir son cepas casi isogénicas (Kronstad, J. W. 1994. Comunicación personal. Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canadá). Tales cepas fueron consideradas como susceptibles de ser transformadas con el gen *iaaL*, a fin de introducir este gen en cepas con un fondo genético casi idéntico, lo que permitiría observar el efecto de la expresión del gen mencionado, disminuyendo la posibilidad de efectos debidos a diferencias entre las cepas.

En este trabajo también se llevó a cabo el análisis de tres cepas solopatógenicas provenientes de diferentes laboratorios (Cuadro 2), así como de dos cepas aisladas de huitlacoche, las cuales fueron previamente reportadas como solopatógenicas (Valverde González, 1992). Adicionalmente, se consideró también la transformación de alguna(s) de las cepas solopatógenicas mencionadas. En vista de que estas cepas no tienen que ser apareadas con ninguna otra cepa para ser infectivas en plantas de maíz, su utilización también tuvo la finalidad de evitar

Cuadro 2. Cepas de *Ustilago maydis* utilizadas en este trabajo.

Cepas	Fenotipo / genotipo relevante	Fuente	Referencia
<b>Silvestres de laboratorio</b>			
FB1	<i>a1b1</i>	F. Banuett	Banuett y Herskowitz (1989)
FB2	<i>a2b2</i>	F. Banuett	Banuett y Herskowitz (1989)
001 (518)	<i>a2b2</i>	J.W. Kronstad	Gold y col. (1994)
002 (521)	<i>a1b1</i>	J.W. Kronstad	Gold y col. (1994)
031	<i>a1b2</i>	J.W. Kronstad	Barrett y col. (1993)
032	<i>a2b1</i>	J.W. Kronstad	Barrett y col. (1993)
Bx711	<i>a1b1</i> isogénica con 002	J.W. Kronstad/Este estudio	
Bx722	<i>a2b2</i> isogénica con 002	J.W. Kronstad/Este estudio	
<b>Diploides/Solopatogénicas</b>			
D12	<i>a1/a2 b1/b2</i>	J. Ruíz-Herrera	Ruíz-Herrera y col. (1995)
d132	<i>a1/a2 b1/b2</i>	J.W. Kronstad	Barrett y col. (1993)
P6D	<i>a2/mfa1 b2/b1E ::Phleo</i>	J.W. Kronstad	Comunicación personal
<b>Silvestres aisladas de huitlacoche</b>			
P1	<i>a1/a2 b?/b?</i> solopatogénica	M.E. Valverde	Valverde González (1992)
P2	<i>a1b?</i>	M.E. Valverde	Valverde González (1992)
T2	<i>a1b1</i>	M.E. Valverde	Valverde González (1992)
T4	<i>a1/a2 b?/b?</i> solopatogénica	M.E. Valverde	Valverde González (1992)
T5	<i>a1b?</i>	M.E. Valverde	Valverde González (1992)

Dra. F. Banuett, Dept. of Biochemistry and Biophysics, University of California-San Francisco, San Francisco CA, EUA.

Dr. J.W. Kronstad, Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canadá.

Dr. J. Ruíz-Herrera, Depto. de Ingeniería Genética de Plantas, U. Irapuato, CINVESTAV-IPN, Irapuato, Gto., México.

Dra. M.E. Valverde, Depto. de Biotecnología y Bioquímica, U. Irapuato, CINVESTAV-IPN, Irapuato, Gto., México.

efectos laterales indeseables sobre el crecimiento, viabilidad y/o producción de AIA y/o de tumores, debidos a las diferencias que se supone existen en los fondos genéticos de la mayoría de las cepas compatibles.

Por otro lado, las cepas aisladas de huitlacoche son cepas silvestres que fueron obtenidas a partir de muestras de huitlacoche colectadas de las ciudades de Pachuca, Hgo. (P1 y P2) y Toluca, Edo. de México (T2, T4 y T5) (Valverde González, 1992). Cabe mencionar que, según análisis previos, las cepas P1 y T4 resultaron ser también cepas solopatogénicas, y que las cepas T2 y T5 resultaron ser compatibles y productoras de altos niveles de infección (tumores grandes y abundantes) en plantas de maíz (Vanegas y col., 1995; Valverde González, 1992).

El mantenimiento de rutina de las cepas enlistadas en la Cuadro 2, así como de aquéllas generadas durante el estudio, se hizo cultivando en agar papa-dextrosa (PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI) a 30 °C por 48 h, y se guardaron a 4 °C. Las cepas también fueron conservadas mezclando 800 µL de un cultivo líquido de la cepa en cuestión [48 h a 30 °C y 200 rpm en caldo papa-dextrosa (PDB; Difco Laboratories, Detroit, MI)] con 70 µL de dimetilsulfóxido (previamente esterilizado por filtración) en un tubo de microcentrífuga estéril, y guardando a -70 °C.

Se utilizaron los vectores de expresión de *Ustilago* pUBLEX1 y pUXV10 (Figura 6) para los experimentos de transformación de *U. maydis* con el gen *iaaL*. El vector pUBLEX1 contiene un fragmento de resistencia a fleomicina/zeocina y es una ligera modificación de la construcción hecha por Gold y col. (1994). Por otro lado, el vector pUXV10 confiere resistencia a higromicina B y es una versión ligeramente modificada del vector pUXV1 descrito por Kinal y col. (1991).

### **5.1.2. Clona del gen *iaaL***

El gen *iaaL* (GenBank M35373) de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, contenido en el plásmido pMON690 (Figura 7; Romano y col., 1991), fue gentilmente proporcionado por el Dr. Harry Klee (Monsanto Company, St. Louis, MO).

### **5.1.3. Cepa de *Escherichia coli***

La cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories) fue utilizada para los experimentos de clonación y de propagación de plásmidos utilizando técnicas descritas (Sambrook y col., 1989).

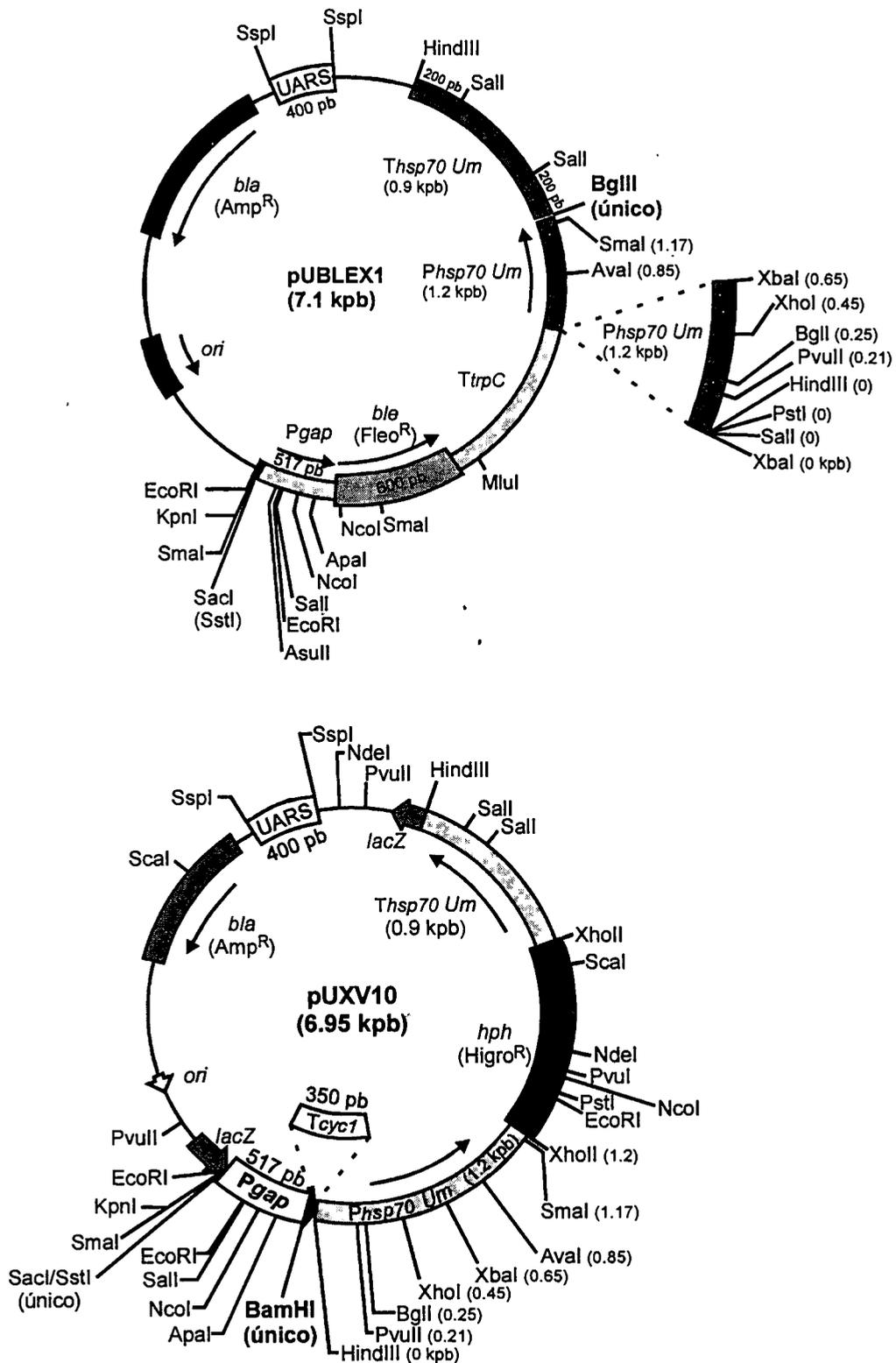
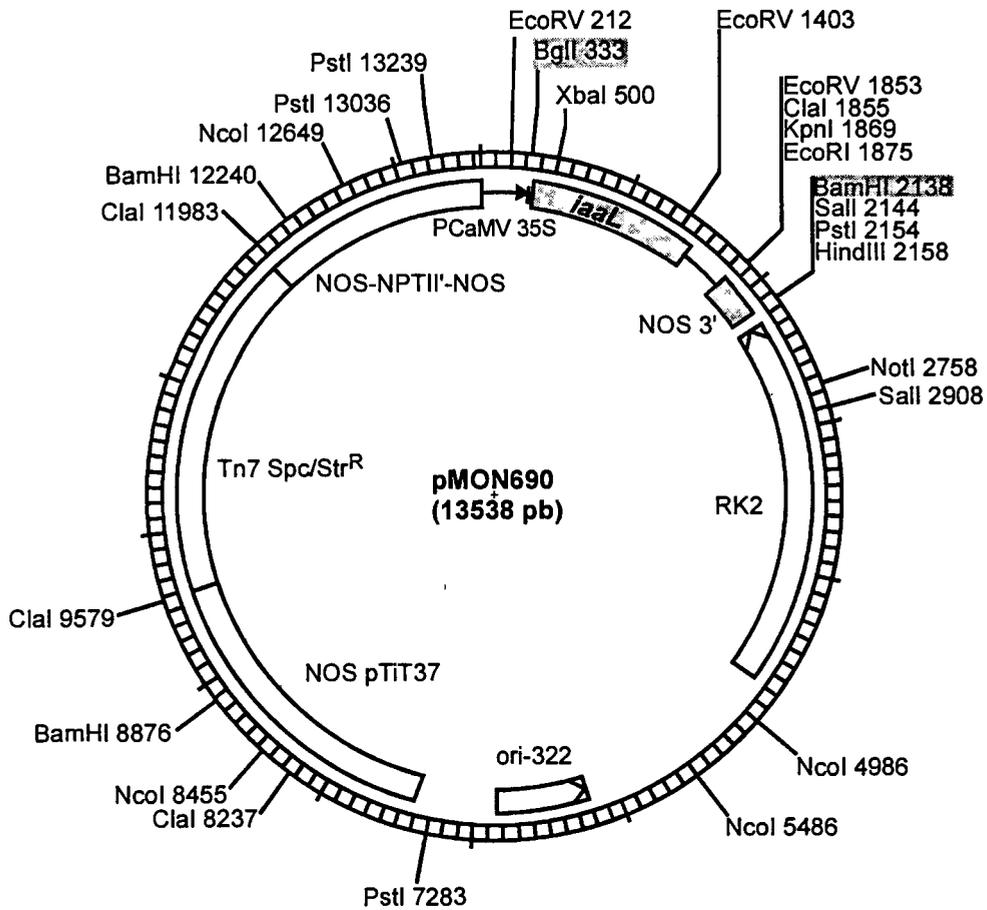


Figura 6. Vectores de expresión de *Ustilago maydis*.  
 Adaptada de Gold y col. (1994) y Kinal y col. (1991).

**A**



**B**

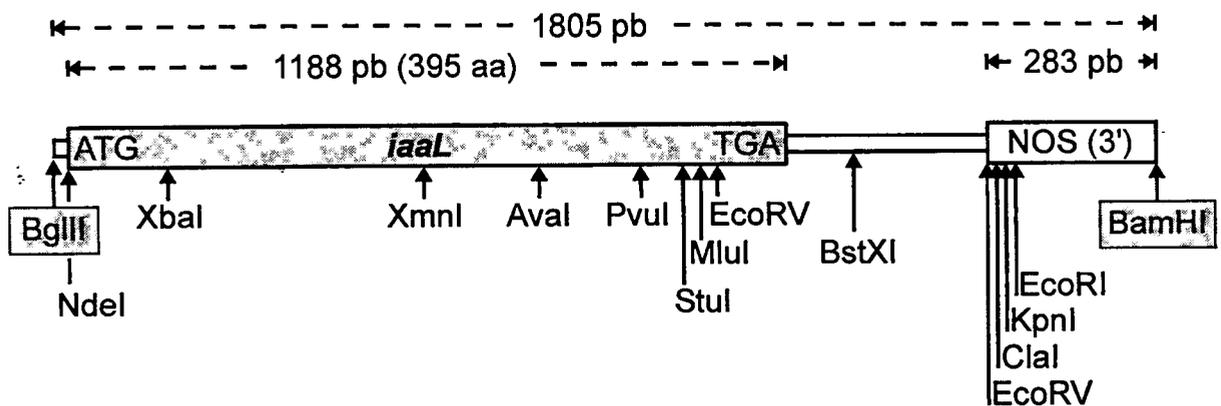


Figura 7. A) Mapa del plásmido pMON690 que contiene al gen *iaaL* de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. B) Mapa del fragmento BglIII-BamHI de 1.8 kpb que contiene al gen *iaaL*.

#### 5.1.4. Plantas de maíz

Para las pruebas de infectividad en plantas de maíz en invernadero, se utilizó la variedad de maíz dulce 'Golden Bantam' (Buckerfield Seeds, Vancouver BC, Canadá) amablemente proporcionada por el Dr. J. W. Kronstad (Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia, Vancouver BC, Canadá). En algunos experimentos se utilizó el maíz híbrido comercial H358 (tipo Bola Chica), el cual es susceptible de infección por *Ustilago maydis*, y que fue generosamente proporcionado por el Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (Celaya, Gto., México).

### 5.2. Métodos

#### 5.2.1. Estrategia general de trabajo

La Figura 8 muestra la estrategia general de trabajo empleada en el estudio. Esta consistió básicamente de tres partes. En la primera se llevó a cabo la mutagénesis de la cepa FB2, una vez que se hicieron análisis preliminares para determinar su capacidad de producción de AIA en cultivo agitado (*in vitro*) y su infectividad en plántulas de maíz. Las cepas mutantes AIA<sup>-</sup> resultantes fueron cruzadas con la silvestre 002 a objeto de generar cepas progenie portadoras de la mutación AIA<sup>-</sup> y que fueran además compatibles, para probar posteriormente su infectividad en plántulas de maíz.

Concurrentemente, la segunda parte del estudio consistió en la caracterización de diversas cepas silvestres de laboratorio, diploides/solopatogénicas y de las aisladas de huitlacoche (Cuadro 2) en cuanto a su producción de AIA *in vitro*, su capacidad de apareamiento *in vitro* y a su capacidad de inducir la formación de tumores en plántulas de maíz en el invernadero. Además de servir como base de comparación para las mutantes generadas en la primera parte del trabajo, estos análisis también sirvieron para seleccionar las cepas que habrían de ser transformadas genéticamente con el gen *iaaL* en la tercera parte del estudio. En ésta, primero se realizaron las construcciones con los vectores de expresión de *Ustilago* a los que se insertó el gen *iaaL* de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Posteriormente se transformaron las cepas seleccionadas para luego confirmar su transformación mediante análisis tipo Southern.

Como se muestra en Figura 8, las cepas mutantes, silvestres y transformadas fueron analizadas en cuanto a su crecimiento y su capacidad de producción de AIA en cultivo *in vitro*, así como en cuanto a su infectividad en

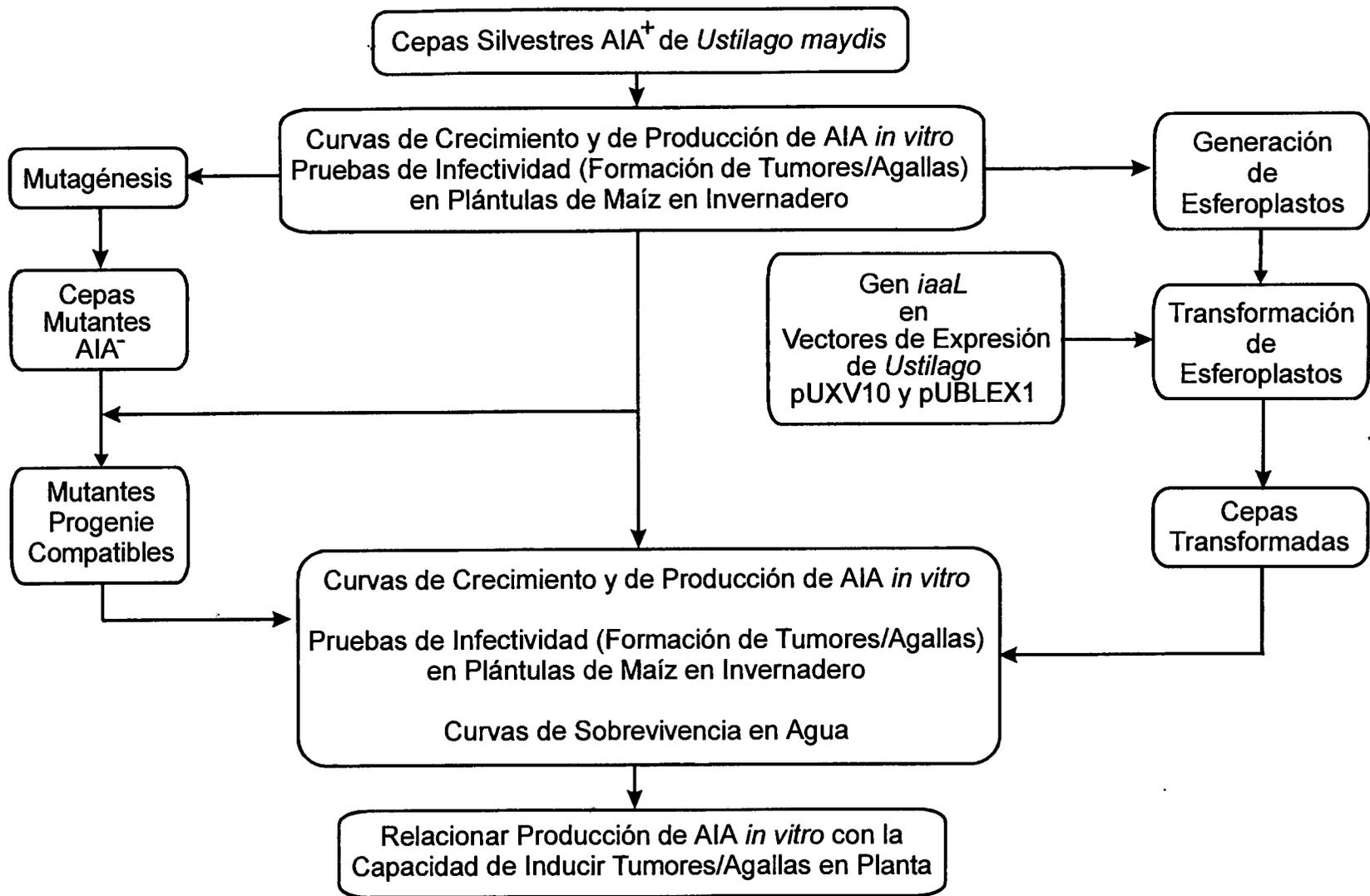


Figura 8. Esquema general de trabajo utilizado en el presente estudio.

plántulas de maíz.

Además, durante el trabajo se realizaron pruebas de apareamiento *in vitro* de las cepas silvestres y mutantes, a objeto de determinar por un lado su capacidad de aparearse con otras cepas (compatibles), y por otro para conocer/confirmar su tipo de apareamiento y la pureza del cultivo. Asimismo, se analizó la capacidad de sobrevivencia en agua de la mayoría de las cepas silvestres, así como de algunas de las generadas en el estudio. Esto tuvo como objetivo observar la viabilidad de las cepas durante la preparación de los inóculos y durante su inyección a las plántulas de maíz en las pruebas de infectividad.

### **5.2.2. Curvas de crecimiento y de producción de AIA**

La determinación de estas curvas tuvo la finalidad de comparar el crecimiento y la producción de AIA de las cepas silvestres (Cuadro 2) a fin de seleccionar aquéllas que produjeran altos niveles de AIA para someterlas a los procesos de mutagénesis o transformación. Además, estas curvas fueron determinadas también para las cepas mutantes y transformadas obtenidas a fin de analizarlas con mayor detalle.

#### **5.2.2.1. Condiciones de cultivo**

Las condiciones rutinarias para la producción de inóculos consistieron en tomar una colonia con un palillo estéril a partir del cultivo sólido, y cultivarla en 5 mL de PDB en un tubo de ensaye de 20 x 150 mm, colocado de manera inclinada en la gradilla de la incubadora, a 30 °C y 200 rpm por 48 h. Los cultivos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio PDB o medio mínimo de Czapek-Dox (Difco Laboratories, Detroit MI), suplementados con 0.1% (p/v) de L-triptofano (Trp) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO) adicionado al medio antes de esterilizar en autoclave. En el caso de las cepas transformadas de *U. maydis*, el medio fue suplementado con 0.25% (p/v) de Trp y con 0.25% (p/v) de L-lisina (Sigma Chemical Company, St. Louis MO); además se añadió zeocina o higromicina B a una concentración de 200 µg/mL, para las construcciones del vector pUBLEX1 como para las del pUXV10, respectivamente. Los matraces fueron inoculados con 0.5 mL de inóculo e incubados a 28-30 °C a 200 rpm durante un tiempo que varió entre 168 y 200 h, período durante el cual fueron muestreados a intervalos regulares como se describe en el siguiente párrafo. Se utilizaron matraces con medio no inoculados como control y como blancos para los análisis posteriores. Cada cultivo se hizo por duplicado.

### **5.2.2.2. Evaluación del crecimiento de los cultivos**

Se tomaron muestras homogéneas de 1.5 mL de cada matríz cada 12 o 24 h durante todo el periodo de incubación (168-200 h) y se les midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro UV/visible DU640 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto CA) como una medida del crecimiento de los cultivos.

Luego cada muestra fue centrifugada a 18,500 xg por 10 min y se transfirió el sobrenadante (medio gastado) a otro tubo, en el que se almacenó a -70 °C hasta su posterior análisis. Algunos paquetes celulares fueron teñidos con azul de tripano para hacer observaciones al microscopio y vigilar la pureza microbiológica de los cultivos. A cada sobrenadante se le determinó la concentración de AIA (expresada como equivalentes de AIA) por duplicado usando el reactivo de Salkowski como se describe más adelante.

### **5.2.2.3. Aplicación de choque térmico a cultivos de cepas transformadas**

Cultivos de las cepas Bx722 y 002 transformadas con construcciones hechas con el vector con promotor inducible (pUBLEX1), fueron sometidos a choques térmicos, para inducir la expresión del gen *iaaL*, y disminuir así la concentración de AIA libre por la acción de la enzima indol-3-acetil-lisina sintetasa. La manera en que esto se llevó a cabo fue la siguiente: cultivos descritos previamente con un tiempo de incubación de 60 h (densidad óptica a 600 nm de 0.9-1.2), fueron sometidos a un choque térmico a 42 °C durante 10 min, en agitación a 200 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 10 h después del tratamiento (Richard y col., 1992). Las muestras fueron analizadas en su densidad óptica a 600 nm como una medida del crecimiento del cultivo, y en su contenido de AIA libre (expresado como equivalentes de AIA) con el reactivo de Salkowski, como se describe más adelante.

## **5.2.3. Detección y cuantificación del AIA**

### **5.2.3.1. Selección del reactivo de Salkowski**

La reacción de Salkowski es una reacción sencilla que resulta en un cambio de color de amarillo a rojo y es utilizada para detectar compuestos indólicos (Glickmann y Dessaux, 1995; Ehmann, 1977; Gordon y Weber, 1951). Es un método sencillo, rápido y barato y se ha usado tradicionalmente en el análisis de tales compuestos. Dado que en la bibliografía existen varias formulaciones para preparar el reactivo de Salkowski, se probaron dos de las más comunes para

conocer cuál es la más útil y seleccionarla para los análisis de AIA en el presente trabajo. Las dos formulaciones probadas fueron: a) la reportada por Gordon y Weber (1951), a la que se denominó reactivo GW, formulada con 1 mL de cloruro férrico 0.5 M más 50 mL de ácido perclórico al 35% (p/p), y la cual se ha reportado que es sensible para concentraciones de 0 a 45  $\mu\text{g}$  de AIA/mL; y b) el reactivo PC (Pilet y Chollet) elaborado con 12 g de cloruro férrico por litro de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.9 M, sensible para concentraciones de 0.3 a 20  $\mu\text{g}$  de AIA/mL (Glickmann y Dessaux, 1995).

Los ácidos perclórico y sulfúrico fueron de JT Baker (Xalostoc, Edo. de México), mientras que el cloruro férrico, el estándar de AIA y el L-triptofano fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Para conocer cuál de los dos reactivos (GW o PC) mostraba mejor linealidad de absorbancia (densidad óptica) a 530 nm contra concentración de AIA, se construyeron curvas de calibración con un estándar de AIA. El estándar de AIA (100  $\mu\text{g}$  de AIA/mL en medio PDB suplementado con Trp al 0.1% (p/v) previamente centrifugado) fue preparado a partir de una solución concentrada de AIA a 10 mg/mL en etanol al 70%.

Con el reactivo GW, cada punto de la curva fue leído contra un blanco hecho con la cantidad apropiada de medio (PDB+Trp centrifugado) más suficiente de este medio conteniendo etanol al 70% para completar 0.5 mL, antes de agregar 1 mL del reactivo de Salkowski. Para el reactivo PC, se usó 1 mL de solución de AIA por cada mililitro del reactivo.

#### **5.2.3.2. Cuantificación mediante el reactivo de Salkowski**

Tanto para la selección de mutantes, como para la cuantificación espectrofotométrica de AIA en la construcción de curvas de producción *in vitro* de este compuesto, se utilizó el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951).

Para la cuantificación espectrofotométrica, primero se construyeron curvas de calibración por triplicado mezclando 1 mL de reactivo de Salkowski con 0.5 mL de cada estándar de AIA (Sigma Chemical Company, St. Louis MO). Las concentraciones de los estándares fueron de 0 a 45  $\mu\text{g}$  de AIA/mL. Después de mezclar, se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, para luego leer absorbancia a 530 nm. Se calcularon las líneas y coeficientes de regresión y de correlación con una calculadora científica de bolsillo. Las ecuaciones de regresión resultantes fueron utilizadas para calcular la concentración de AIA en los sobrenadantes de las muestras (medio gastado) de

los cultivos de *U. maydis*. Para esto se mezclaron 0.5 mL de la muestra de medio gastado con 1 mL de reactivo de Salkowski (Gordon y Weber, 1951). Enseguida los tubos se agitaron y se dejaron reposar 30 min en la oscuridad, al cabo de los cuales se leyó su absorbancia a 530 nm en el espectrofotómetro. Como blanco se utilizó el mismo medio de cultivo sin inocular pero incubado en las mismas condiciones que el cultivo. Se substituyeron las lecturas de absorbancia en la ecuación de regresión previamente obtenida a objeto de calcular las concentraciones de AIA. Dichas concentraciones fueron expresadas como equivalentes de AIA (en  $\mu\text{g/mL}$ ) en vista de la posible presencia de otros compuestos indólicos relacionados al AIA, presentes en los cultivos de *U. maydis* (Basse y col., 1996; Navarre, 1990) y que también dan reacción con el método de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995).

#### **5.2.3.3. Cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Dado que la reacción de Salkowski es un método presuntivo para detectar compuestos indólicos y no es 100% específico para AIA (Glickmann y Dessaux, 1995; Crozier y col., 1988), fue preciso corroborar la identidad del AIA en los cultivos, así como algunos de los niveles evaluados, por algún otro método. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es un método confiable que ha permitido cuantificar niveles de AIA producido por microorganismos (Yamada y col., 1990a; Crozier y col., 1988).

La preparación de la muestra para ser inyectada al cromatógrafo de HPLC involucró los pasos descritos a continuación. Primero se midió la cantidad de muestra (sobrenadante) disponible (previamente centrifugada en condiciones ya descritas) y se transfirió a un tubo de centrifuga de 25 mL. Luego se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de metanol filtrado conteniendo hidroxitolueno butilado (BHT) a una concentración 20 mM. Se adicionó un volumen de HCl 0.1 M con el fin de protonar completamente el AIA presente. A esto se agregó 1 mL de acetato de etilo, el cual es el agente que extrae el AIA protonado. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta que se separaron las fases. Se transfirió la fase superior a un matrón para. En estos pasos, los recipientes estuvieron protegidos contra la luz, ya que el AIA semipurificado es fotodegradable.

Se hicieron dos extracciones más adicionando acetato de etilo puro. A fin de eliminar el agua presente en la muestra, se añadió un poco de sulfato de sodio anhidro para absorberla. Posteriormente la muestra fue llevada a sequedad en un

Rotavapor RE111 (Büchi, Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Suiza) a 30°C con vacío para eliminar todo el acetato de etilo. Los últimos residuos de éste se eliminaron con una corriente de nitrógeno, con flujo moderado en campana de extracción. El residuo se redisolvió en aproximadamente 200 µL de metanol y se concentró nuevamente con nitrógeno gaseoso. El extracto concentrado se filtró con una membrana Millipore de teflón con poros de 0.5 µm de diámetro. Después de enjuagar el vial y el filtro, se ajustó el volumen final de extracto a un volumen conocido. Dependiendo del volumen final, se usó un vial normal (con capacidad de 1 mL) o un vial cónico (con capacidad de 200 µL). Finalmente se guardó el extracto, protegido contra la luz, a -70 °C hasta que se efectuó su análisis por HPLC.

El cromatógrafo utilizado fue un HPLC Hewlett-Packard modelo 1050 (Palo Alto CA) equipado con sistema cuaternario de bombeo y desgasificación de disolventes, automuestreador, un detector de arreglo de diodos, y un programa integrado Chemstation en una computadora HP Vectra 486/66XM. La separación de AIA se llevó a cabo inyectando 10 µL de muestra a una columna Vydac C-18 de 5 µm de tamaño de partícula, 25 cm de longitud y 4.5 mm de diámetro interno (Separations Group, Alltech Associates, Deerfield IL). La elución se llevó a cabo con el siguiente programa: los 20 min iniciales usando isocráticamente 4% (v/v) de metanol en solución acuosa de acetato de amonio 20 mM, pH 6.5, y con un gradiente lineal de 4-76% (v/v) de metanol en solución acuosa de acetato de amonio 20 mM durante los siguientes 40 minutos; se usó un flujo de 0.5 mL/min durante toda la corrida. La detección se llevó a cabo a 280 nm y se obtuvieron espectros de absorbancia en el intervalo UV entre 200 y 375 nm. La identificación y cuantificación de AIA se basó en la comparación de tiempos de retención, áreas de los picos, y espectros de absorbancia, con los del AIA estándar (Sigma Chemical Company, St. Louis MO).

#### **5.2.4. Mutagénesis y selección de mutantes**

Como primer paso en este punto, se compararon el crecimiento y la producción de AIA de la cepa FB2 con los de algunas de las otras cepas silvestres (Cuadro 2), para corroborar la producción abundante de AIA (fenotipo AIA<sup>+</sup>) por la cepa a ser mutagenizada. En base a estos análisis, se utilizó principalmente la cepa silvestre FB2 como fuente para la generación de mutantes con defectos en la producción de AIA (fenotipo AIA<sup>-</sup>). Se llevó a cabo la mutagénesis usando radiación ultravioleta (UV) de acuerdo a Barrett y col. (1993) en vista de que la

técnica ha demostrado ser útil en la generación de mutantes de *U. maydis*. Para esto, primero se preparó un inóculo en las condiciones descritas a continuación. Las condiciones rutinarias para la producción de inóculos consistieron en tomar una colonia con un palillo estéril a partir del cultivo sólido, y cultivarla en 5 mL de PDB en un tubo de ensaye de 20 x 150 mm, colocado de manera inclinada en la gradilla de la incubadora, a 30 °C y 200 rpm por 48 h. Luego 2 mL de este inóculo fueron añadidos a 18 mL de PDB en un matríz Erlenmeyer, el cual fue incubado por 7 h a 30 °C y 200 rpm. Después de centrifugar el cultivo, las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en agua destilada estéril para obtener una suspensión con aproximadamente  $10^8$  células por mililitro. Se colocaron alícuotas de 1 mL en cajas de Petri de 60 x 15 mm, las cuales fueron expuestas a una lámpara UV (254 nm) colocada a 5 cm de distancia encima de la caja abierta. La irradiación de la suspensión con agitación constante se llevó a cabo durante aproximadamente 3 min a fin de matar alrededor del 90% de las células. Las células irradiadas fueron diluidas y sembradas en cajas con medio mínimo de Czapek-Dox sólido (Difco Laboratories, Detroit, MI) o en PDA, e incubadas por 48 h a 30 °C en la oscuridad a objeto de obtener de 100 a 300 colonias por caja.

Además se utilizó un método alternativo de mutagénesis con ácido clofibrico (ACF) (ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metil-propanoico; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), basado en la técnica de Yamada y col. (1990b). El tratamiento de mutagénesis consistió en esparcir alrededor de  $5 \times 10^6$  células de *U. maydis* en crecimiento activo en una placa de medio mínimo de Czapek-Dox sólido conteniendo 0.1% (p/v) de extracto de levadura y 7 mM/L de ACF, seguido por incubación a 22 °C por 48 h. Las colonias que crecieron fueron enseguida cultivadas en medio mínimo de Czapek-Dox o en PDA.

La selección de cepas con fenotipo AIA<sup>-</sup> se llevó a cabo cultivando cada aislado en un pozo de una placa de microtitulación, usando 100 µL de PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano por pozo, seguido por incubación de la placa a 30 °C y 200 rpm por 72 h. Se incluyeron las cepas silvestres originales con fines de comparación, así como un control negativo conteniendo solo medio de cultivo sin inocular. A continuación se mezclaron 50 µL de cada cultivo con 100 µL de reactivo de Salkowski (Gordon y Weber, 1951) en una placa aparte, dejando luego reposar a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad. Después de esto, las cepas que mostraron una reacción de Salkowski de baja intensidad (rosa pálido o amarillo), lo cual es indicativo de bajos niveles de AIA en el cultivo, fueron recuperadas del cultivo líquido remanente y sembradas en PDA. Estas cepas

fueron consideradas como candidatas a mutante AIA<sup>-</sup> y se incubaron a 30 °C por 48 h y se guardaron como ya se describió. Estas cepas fueron analizadas con mayor detalle en cuanto a su crecimiento y producción de AIA en medio mínimo de Czapek y/o en PDB, ambos adicionados de triptofano, a fin de corroborar la naturaleza protótrofa de las cepas, así como su menor o nula producción de AIA en cultivo *in vitro*.

Además, se probó el efecto de adición de diversos suplementos nutricionales al medio mínimo de Czapek-Dox sólido sobre el crecimiento de algunas de las mutantes obtenidas. Entre los suplementos probados se incluyeron los 20 L-aminoácidos que comúnmente se encuentran en las proteínas, además de L-cistina e hidroxil-L-prolina. También se probaron el uracilo, adenina, guanina y doce vitaminas, así como nitrito de sodio y cloruro de amonio como fuentes de nitrógeno, y diez diferentes carbohidratos (monosacáridos y disacáridos) como fuentes de carbono. Las pruebas se realizaron inoculando en medio mínimo de Czapek-Dox una dilución 10<sup>-2</sup> de células de cada cepa previamente cultivadas en PDB durante 48 h y lavadas dos veces con agua desionizada estéril. Una vez inoculada la caja, se dejó secar el exceso de humedad y se adicionó una pequeña cantidad (1-3 mg) del suplemento en forma de cristales o líquida según el caso. Enseguida se incubó a 30 °C por 48 horas y se observó el crecimiento de las cepas con y sin suplemento añadido. Se incluyeron varias cepas silvestres en estos análisis, entre ellas la FB2.

### **5.2.5. Análisis de mutantes AIA<sup>-</sup>**

El análisis de las mutantes involucró primero cruzar cada mutante con una cepa silvestre compatible, infectando plántulas de maíz con la mezcla de esporidias, como se describe más adelante. Aproximadamente 15 días después de la inoculación, se extrajeron las teliosporas a partir de las agallas maduras según ligeras modificaciones de las técnicas de Valverde González (1992) y Christensen (1963), para luego hacerlas germinar en PDA. Enseguida, el muestreo al azar de las teliosporas germinadas, la dilución de las muestras y su cultivo en cajas con PDA permitió obtener, a partir de la progenie esporidial, aislados susceptibles de una nueva selección para detectar aquéllos que mostraran el fenotipo AIA<sup>-</sup> presente en la mutante original (progenitor). Una vez que se identificaron los aislados que llevaban la mutación, se les determinó el tipo de apareamiento. Esta determinación se realizó mediante la observación de micelio aéreo (reacción "fuzzy") que se forma cuando dos cepas compatibles crecen juntas y se aparean

en un medio enriquecido especial. Esta reacción se lleva a cabo en medio completo doble de Holliday conteniendo 1% (p/v) de carbón activado (Holliday, 1974; Day y Anagnostakis, 1971) usando a las cepas 001, 002, 031 y 032 como patrones de tipo de apareamiento conocido (Cuadro 2).

El análisis de las segregantes descrito se llevó a cabo a fin de obtener información importante sobre la naturaleza de la mutación. Además, el análisis se realizó fundamentalmente para lograr el aislamiento de cepas mutantes AIA<sup>-</sup> con tipos de apareamiento compatibles. Como se describe más adelante, dichas cepas mutantes fueron inoculadas en plántulas de maíz a fin de llevar a cabo una evaluación cuantitativa de su capacidad de formar tumores/agallas en la planta. Esto aunado a los datos de su crecimiento y producción de AIA *in vitro*, permitió determinar el efecto de las mutaciones sobre la capacidad del hongo de formar agallas en planta.

#### **5.2.6. Construcción de vectores de expresión de *U. maydis* con el gen *iaaL***

El principal objetivo de esta parte del proyecto fue transferir el fragmento de DNA que contiene al gen *iaaL* hacia los vectores de expresión de *Ustilago* pUXV10 y pUBLEX1 (Figura 6). Las construcciones de replicación autónoma resultantes fueron posteriormente introducidas a células/cepas esporidiales de *U. maydis* (como se describe más adelante) a objeto de transformarlas con copias múltiples del gen *iaaL* y analizar el posible efecto de dicho gen sobre la producción *in vitro* de AIA y sobre la patogenicidad de las cepas. Todas las manipulaciones de DNA, tales como digestiones con enzimas de restricción, purificación y concentración de DNA, separación y visualización de plásmidos y fragmentos en geles de agarosa, tratamiento de vectores abiertos con fosfatasa alcalina, ligamiento de insertos y vectores, transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ , cultivo y análisis de transformantes, extracción y purificación de DNA plasmídico y análisis de restricción de plásmidos, fueron llevados a cabo de acuerdo a protocolos ya descritos y comúnmente aceptados (Sambrook y col., 1989). También se usaron los protocolos recomendados por las compañías que manufacturan las enzimas y sistemas de reactivos que fueron utilizados.

##### **5.2.6.1. Digestión de los plásmidos y cuantificación de DNA**

Primeramente, se obtuvo un fragmento BglIII-BamHI de 1.8 kpb conteniendo al gen *iaaL* a partir del plásmido pMON690 (Figura 7). A este fragmento se le denomina inserto *iaaL* en lo sucesivo en este estudio. Para liberar

el inserto, primero se digirió el plásmido con las enzimas BglII y BamHI (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD).

Separadamente, se digirieron los vectores pUBLEX1 y pUXV10 con las enzimas BglII y BamHI, respectivamente, a fin de abrirlos en sus sitios únicos de clonación. El DNA de cada vector se concentró por precipitación con etanol y fue secado a temperatura ambiente. Finalmente el DNA fue disuelto en amortiguador TE (Sambrook y col., 1989). Ambos plásmidos abiertos se trataron con fosfatasa alcalina de ternero siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania); esta desfosforilación se llevó a cabo para evitar religamiento de los vectores. La enzima se inactivó calentando a 65 °C por 1 h. Finalmente todas las muestras fueron mantenidas a -20 °C. La concentración del DNA se determinó en una dilución 1:10 ó 1:100 en agua desionizada estéril, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro UV-visible DU640 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto CA). Se corrieron los DNAs digeridos en geles de agarosa al 1% en TAE 1x a 70 V durante 1.5 h (Sambrook y col., 1989).

#### **5.2.6.2. Purificación del fragmento de DNA conteniendo al gen *iaaL***

El inserto *iaaL* fue purificado utilizando el kit GeneClean II (Bio 101 Inc., La Jolla CA) después de haberlo separado preparativamente en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% corrido en las condiciones anteriormente descritas. Se midió la concentración del fragmento purificado en el espectrofotómetro como se describió anteriormente.

#### **5.2.6.3. Reacciones de ligación**

A cada una de los vectores de expresión se le adicionó 1.5 µg del inserto *iaaL* por cada 2 µg del vector (relación molar 3:1). Se agregó 0.5 U de DNA ligasa de T4 (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD) por reacción, ajustando a un volumen final de 70 µL con agua destilada estéril y amortiguador de reacción para la enzima. Las reacciones de ligación se incubaron a 16 °C por 15 h y se almacenaron a -20 °C (Sambrook y col., 1989).

#### **5.2.6.4. Preparación de células competentes de *E. coli***

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD). La obtención de células competentes consistió en tomar una colonia de la bacteria cultivada en agar LB, y transferirla a 5

mL de medio líquido en tubo; la incubación se hizo a 37 °C toda la noche con agitación vigorosa. De este cultivo se inoculó con 50 µL a un matr az Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo LB. Se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9-1.2 unidades de absorbancia a 600 nm (aproximadamente 10<sup>8</sup> células/mL). El cultivo se centrifugó a 4,200 xg en rotor GS3 (Sorvall-Dupont) por 10 min a 4°C. Los tubos fueron drenados colocándolos en posición invertida, en condiciones de esterilidad. El paquete celular fue resuspendido en CaCl<sub>2</sub> 0.1 M a 4°C previamente esterilizado por filtración, utilizando una membrana tipo HA de 0.22 µm (Millipore Corporation, Bedford MA).

Las células fueron centrifugadas nuevamente a 4,200 xg por 10 min a 4 °C. Los tubos se drenaron en las mismas condiciones. El paquete celular fue resuspendido en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M a 4°C. La solución fue dividida en alícuotas de 200 µL en tubos de microcentrífuga y mantenidas a 70 °C (Sambrook y col., 1989).

#### **5.2.6.5. Transformación de *E. coli***

Se descongelaron 200 µL de suspensión de células competentes en baño de hielo y se mezclaron 50 µL de suspensión con 50 ng de DNA de cada reacción de ligación de los vectores de expresión con el fragmento *iaaL* contenidos en un volumen de 10 µL. Se incluyeron controles de transformación para verificar la viabilidad de las células competentes, la actividad del antibiótico en el medio selectivo y la eficiencia de desfosforilación del tratamiento con fosfatasa alcalina realizado en los vectores. Las mezclas fueron transferidas a 42 °C por un tiempo de incubación exacto de 90 seg sin agitación. Después se pasaron a un baño de hielo por 2 min. Se adicionó 800 µL de medio LB y se incubó a 37 °C durante 45 min. Se transfirieron 200 µL de cada mezcla a agar LB con 100 µg de ampicilina por mililitro de medio (LB-Amp100), extendiendo el inóculo con varilla de vidrio sobre la placa. La incubación fue a 37 °C durante 20 h. Las colonias obtenidas fueron tomadas con palillos estériles y sembradas en tubos con 5 mL de caldo LB-Amp100 (Sambrook y col., 1989).

#### **5.2.6.6. Minipreparación de DNA de plásmidos**

Se utilizó el método de lisis alcalina según Sambrook y col. (1989). Se transfirió cada colonia bacteriana obtenida a 5 mL de medio LB-Amp100 y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación. Se centrifugó 1.5 mL del cultivo en tubos de microcentrífuga a 18,500 xg por 1 min y se desech  el sobrenadante. El

paquete celular se resuspendió en 100 µL de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25mM, pH 8.0 EDTA 10 mM). Para lisar las células se agregaron 200 µL de solución II (NaOH 0.2 N, dodecil sulfato de sodio 0.5 %), y se mezcló e incubó a 4 °C durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 150 µL de solución III (acetato de sodio 3M, pH 5.4) y se incubó a 4 °C por 10 min. Se centrifugó la mezcla a 18,500 xg por 10 min, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, donde se extrajeron las proteínas con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1 v/v). La fase acuosa se lavó con un volumen de cloroformo. La fase acuosa se mezcló con un volumen igual de isopropanol a -20 °C y se centrifugó a 18,500 xg por 5 min. El sedimento obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril.

#### **5.2.6.7. Análisis de restricción de las construcciones**

Las construcciones preparadas fueron digeridas con la enzima Xba I en las condiciones adecuadas para esta enzima. Se analizaron los fragmentos digeridos en geles de agarosa al 1%, corridos en TAE 1x a 70 V, durante 1.5 h. Se seleccionaron las clonas transformadas de cada vector de expresión que daban patrones de bandas indicativos de la presencia del inserto *iaaL* en orientación correcta de acuerdo al promotor, en orientación invertida y del vector sin inserto.

#### **5.2.6.8. Maxipreparaciones de DNA de las construcciones**

Se hicieron cultivos de las clonas seleccionadas para obtener material plasmídico suficiente para transformar *U. maydis*. El procedimiento fue el establecido por el kit Wizard Plus Maxipreps (Promega, Madison WI). Las concentraciones de DNA fueron determinadas en las condiciones previamente descritas y las preparaciones fueron mantenidas a -20 °C.

#### **5.2.7. Transformación de *U. maydis* y selección de transformantes**

La finalidad principal de esta parte del proyecto fue la de generar cepas transformadas de *U. maydis* que mostrasen producción anormal de AIA por efecto de la introducción y expresión del gen *iaaL*.

##### **5.2.7.1. Formación de esferoplastos**

Para la preparación de esferoplastos se utilizó el protocolo de Wang y col. (1988) con ligeras modificaciones. Las cepas de *U. maydis* seleccionadas para ser transformadas fueron cultivadas en 50 mL de medio líquido YEPS (extracto de

levadura 1%, bacto-peptona 2%, sacarosa 2%) a 30 °C, hasta alcanzar una densidad óptica de 1-1.2 a 600 nm. Los cultivos fueron centrifugados a 4,200 xg por 10 min. Las células fueron lavadas con solución SCS (citrato de sodio 20 mM, sorbitol 1 M, pH 5.8), y centrifugadas de la misma manera. El paquete celular fue resuspendido en 200 µL de una solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Novozym 234; Sigma Chemical Company, St. Louis MO) a una concentración de 100 mg/mL en solución de SCS, previamente esterilizada por filtración en membrana de 0.22 µm. La mezcla fue incubada por 45 min a temperatura ambiente y con agitación suave (50 rpm) en tubos de centrifuga de 50 mL colocados de manera inclinada. La formación de los esferoplastos fue observada al microscopio a intervalos de 5 min. La suspensión fue centrifugada a 140 xg por 8 min y los esferoplastos lavados 2 veces con 1 mL de solución de SCS, centrifugando a 140 xg por 8 min. Finalmente las células fueron lavadas con solución STC (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 M, sorbitol 1 M, pH 7.5) y centrifugadas de la misma manera. Los esferoplastos se resuspendieron en 1 mL de STC a 4 °C.

Los esferoplastos se almacenaron a -70 °C mezclando 10 µL de β-mercaptoetanol (13.4 M), 50 µL de dimetilsulfóxido esterilizado por filtración, 250 µL de una solución de polietilenglicol (PEG) 3350 al 66% en STC sin sorbitol, y 1 mL de suspensión de esferoplastos. Los esferoplastos fueron repartidos en alícuotas de 200 µL y almacenados a -70 °C.

#### **5.2.7.2. Transformación de las cepas seleccionadas de *U. maydis***

Para la transformación de *U. maydis* se siguió un protocolo basado en las técnicas descritas previamente por Tsukuda y col. (1988) y Wang y col. (1988). Se descongelaron 200 µL de la suspensión almacenada de esferoplastos en baño de hielo. A 50 µL de la suspensión, se adicionó 1 µg de DNA del plásmido transformante contenido en 5 µL de STC más 1 µL de heparina a 15 µg/µL a 4 °C. Se incluyeron células sin adición de DNA como controles. La suspensión se mantuvo por 20 min en baño de hielo. Después se adicionó 0.5 mL de una solución de PEG 3350 al 40% en STC. Se incubó por 30 min en baño de hielo. Posteriormente se le adicionó 0.5 mL STC, y se centrifugó a 380 xg por 5 min. El sobrenadante fue aspirado y el paquete celular se resuspendió en 200 µL de medio doble completo de Holliday conteniendo sorbitol 1M (MDC-S) (Holliday, 1974; Wang y col., 1988). La suspensión de células fue extendida en cajas con agar MDC-S con el antibiótico zeocina (CAYLA SARL, Toulouse, Francia) o higromicina B, (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD) a una

concentración de 200 µg/mL, para seleccionar las células transformadas con las construcciones de los vectores pUBLEX1 y pUVX10, respectivamente. Se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 7 días hasta la aparición de colonias bien definidas. Una vez desarrolladas las colonias fueron sembradas en 5 mL en PDB conteniendo el antibiótico adecuado durante 3 días a 28 °C a 200 rpm. Posteriormente las cepas fueron sembradas en PDA con antibiótico y mantenidas a 4°C.

### **5.2.7.3. Nomenclatura de cepas transformadas de *Ustilago maydis***

En el Cuadro 3 se describe el significado de la nomenclatura empleada para identificar cada una de las cepas transformadas. Como ejemplo se muestran los nombres empleados para las transformantes obtenidas de la cepa Bx722. En el Cuadro 4 se muestran las cepas transformadas que fueron obtenidas con ambos vectores (pUBLEX1 y pUXV10).

### **5.2.8. Confirmación de transformación de *U. maydis* mediante análisis de Southern**

Esta técnica fue originalmente desarrollada por Southern (1975) y se llevó a cabo para corroborar la presencia de la secuencia del gen *iaaL* y del vector de expresión pUBLEX1 en las cepas transformadas con sus construcciones. En general en esta metodología, los fragmentos de DNA que han sido separados de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfieren por capilaridad a membranas de nylon o nitrocelulosa y se inmovilizan por calentamiento o con radiación ultravioleta. Las posiciones relativas de los fragmentos de DNA separados en la electroforesis no se modifican durante la transferencia a la membrana. Este DNA es posteriormente hibridado con una sonda marcada radioactivamente. La membrana es lavada con una solución de baja fuerza iónica para eliminar el DNA no complementario unido inespecíficamente. Posteriormente la membrana se envuelve en plástico delgado y se coloca en una caja hermética de autorradiografía junto a una película fotográfica, en la cual se velan los sitios donde se unió la sonda marcada. Este procedimiento permite localizar secuencias de DNA que son complementarias a la sonda utilizada.

#### **5.2.8.1. Obtención de DNA de las cepas sin transformar y transformadas**

Se obtuvo DNA total de cada cepa original (no transformada) o

Cuadro 3. Ejemplo de la nomenclatura empleada para las cepas transformadas de *Ustilago maydis*.

Cepa no transformada	Vector usado en la transformación						Nombre de la cepa transformada
	pUBLEX1 (pPh)			pUXV10 (pHy)			
	Sin inserto	Con inserto <i>iaaL</i> en orientación		Sin inserto	Con inserto <i>iaaL</i> en orientación		
	<i>iaaL</i>	Correcta	Invertida	<i>iaaL</i>	Correcta	Invertida	
Bx722	pPh						Bx722-pPh
Bx722	pPh	Lc					Bx722-pPhLc
Bx722	pPh		Li				Bx722-pPhLi
Bx722				pHy			Bx722-pHy
Bx722				pHy	Lc		Bx722-pHyLc
Bx722				pHy		Li	Bx722-pHyLi

Cuadro 4. Cepas transformadas de *Ustilago maydis* obtenidas en este estudio.

Cepas	Vector	Inserto	Orientación	Resistencia	Promotor
002-pPhLc	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	correcta	Zeocina	Inducible
002-pPhLi	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	invertida	Zeocina	Inducible
002-pHyLc	pUXV10	<i>iaaL</i>	correcta	Higromicina B	Constitutivo
002-pHyLi	pUXV10	<i>iaaL</i>	invertida	Higromicina B	Constitutivo
Bx722-pPhLc	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	correcta	Zeocina	Inducible
Bx722-pPhLi	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	invertida	Zeocina	Inducible
Bx722-pHyLc	pUXV10	<i>iaaL</i>	correcta	Higromicina B	Constitutivo
Bx722-pHyLi	pUXV10	<i>iaaL</i>	invertida	Higromicina B	Constitutivo
D12-pPhLc	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	correcta	Zeocina	Inducible
D12-pPhLi	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	invertida	Zeocina	Inducible
D12-pPh	pUBLEX1	sin <i>iaaL</i>		Zeocina	Inducible
d132-pPhLc	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	correcta	Zeocina	Inducible
d132-pPhLi	pUBLEX1	<i>iaaL</i>	invertida	Zeocina	Inducible
d132-pPh	pUBLEX1	sin <i>iaaL</i>		Zeocina	Inducible

transformada. El procedimiento consistió en preparar 1 L de cultivo en PDB para cada cepa, usando el antibiótico zeocina para las cepas transformadas. Los cultivos se incubaron a 28° C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 1-1.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Los cultivos fueron centrifugados a 4,200 xg a temperatura ambiente durante 10 min. El paquete celular fue resuspendido con una solución de lavado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 M, NaCl 50 mM, pH 8) y centrifugado a 4,200 xg. Los paquetes celulares fueron entonces liofilizados. Las células liofilizadas fueron molidas con nitrógeno líquido en mortero preenfriado a -70 °C. El polvo fue resuspendido en solución de lisis (Tris-HCl 0.2 M, EDTA 0.1 M, Sarcosil 1 %, proteinasa K 100 µg/mL, pH 8), la cual fue mantenida previamente 20 min a 37° C para eliminar posibles DNAsas contaminantes. La proporción utilizada fue de un gramo de células liofilizadas por cada 10 mL de solución de lisis. La mezcla de células molidas y solución de lisis fue incubada a 45-50 °C durante 1 h. La suspensión fue centrifugada a 11,900 xg en rotor SS34 (Sorvall-Dupont) durante 30 min a 4 °C. Se agregó al sobrenadante un volumen de fenol saturado con Tris HCl 1 M, pH 8.0, agitando por inversión suavemente. Se dejó reposar 2 min, y se centrifugó a 15,000 rpm (26,800 xg) en rotor SS34 (Sorvall-Dupont) durante 20 min a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v), agitándose suavemente por inversión. Se dejó reposar 2 min, y se centrifugó a 11,900 xg durante 20 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se hizo un segundo tratamiento con cloroformo: alcohol isoamílico (1:1, v/v). El DNA del sobrenadante fue precipitado con 2 volúmenes de etanol al 100% a -20 °C. Se dejó reposar 2 h en hielo y se centrifugó a 26,800 xg por 30 min. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% a -20 °C, centrifugando a 11,900 xg a 4°C. Los precipitados lavados fueron secados en campana de flujo laminar por 5 h. El DNA se resuspendió suavemente en 1 mL de TE pH 7.6. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

#### **5.2.8.2. Purificación del DNA total**

Las muestras de DNA de *U. maydis* fueron tratadas con un volumen de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), se agitó 1 min suavemente y se centrifugó a 11,900 xg a 4 °C por 10 min. Al sobrenadante se le adicionó 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Se agitó 1 minuto y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2. El DNA se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol al 100% a 4°C. Se agitó suavemente y se enfrió hasta -20 °C durante 30

min. La solución fue centrifugada a 11,900 xg durante 20 min a 4°C. El precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70% mantenido a 4°C, centrifugando a 11,900 xg por 10 min en cada caso. El DNA fue resuspendido en 1 mL de solución de TE pH 7.6. Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría a 260 nm en condiciones ya descritas.

#### **5.2.8.3. Digestiones del DNA total**

Se llevaron a cabo digestiones del DNA total de *U. maydis* con la enzima BglII para abrir (linearizar) las construcciones, así como digestiones dobles con BglII y EcoRV para liberar el fragmento *iaaL*. El DNA total digerido fue de 100 µg agregando 10 unidades de cada enzima para cada muestra. El DNA total de *U. maydis*, sin digerir y digerido y con Bgl II y/o Eco RV se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x con un voltaje de 60 V durante 2 h. Posteriormente el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (2 µg/mL) y se fotografió con cámara instantánea Polaroid. Después de esto se llevó a cabo la transferencia a membranas de nylon.

#### **5.2.8.4. Transferencia del DNA a la membrana**

El gel se incubó en solución 0.25 N de HCl por 10 min, para luego ser lavado dos veces con agua destilada a temperatura ambiente con agitación suave. El gel fue tratado en NaOH 0.5 M, NaCl 0.6 N durante 15 min y luego dos veces más por 30 min cada una. La transferencia se realizó por capilaridad por un tiempo de 3 h a una membrana de nylon con carga positiva (SureBlot Nylon Hybridization Membrane, Oncor, Gaithersburg MD), colocando para ello suficiente papel absorbente. El DNA fue fijado por calentamiento de la membrana a 80 °C durante 30 min al vacío (Sambrook y col., 1989).

#### **5.2.8.5. Marcaje radiactivo por iniciador de secuencia al azar ("random priming")**

Esta técnica utiliza secuencias al azar constituidas por hexanucleótidos que hibridan con el DNA que se desea marcar en numerosos sitios a lo largo del DNA patrón desnaturizado. Se utilizó el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa de *E. coli* en esta reacción de marcaje. El marcaje por iniciador de secuencia al azar se llevó al cabo usando el paquete de reactivos Prime-It II Random Priming Labeling Kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA). El procedimiento primero consistió en desnaturizar por calentamiento al DNA del

vector pUBLEX1 (Figura 6) digerido con BglII, o a un fragmento BglII-EcoRV de 1.1 kpb, obtenido por digestión de pMON690, que contiene la mayor parte del gen *iaaL* (Figura 7). Posteriormente se añadió el amortiguador de reacción, el cual contiene los hexámeros de secuencia al azar, además de MgCl<sub>2</sub> y los desoxirribonucleósido trifosfatos dATP, dTTP y dGTP. Enseguida se agregó el dCTP marcado radioactivamente con <sup>32</sup>P, y luego se adicionaron 5 U de la enzima Klenow. La reacción de marcaje se llevó a cabo a 37 °C durante 15 min. La reacción fue detenida agregando EDTA a una concentración final de 2 mM. El nucleótido radiactivo no incorporado fue retirado por filtración en gel, centrifugando por 2 min a 1,000 xg a través de columnas de Sephadex G-50. La sonda marcada radioactivamente fue desnaturalizada por calentamiento a 95 °C durante 5 min y enfriada en hielo por 5 min.

#### **5.2.8.6. Condiciones de prehibridación**

Mediante este procedimiento se bloquearon los sitios libres en la membrana de nylon donde no se unió DNA. Para tal efecto la membrana se incubó con la solución de prehibridación ( Hybrisol I, Oncor, Gaithersburg MD ) a 42 °C, durante 16 h.

#### **5.2.8.7. Condiciones de hibridación**

La sonda marcada previamente desnaturalizada fue agregada a los tubos de hibridación conteniendo las membranas. La hibridación se llevó a cabo durante 12 h a 42°C en este caso por ser sondas homólogas. Transcurrido el tiempo de hibridación, las membranas fueron lavadas para eliminar la hibridación no específica. Primero, con una solución de SSC 2x (SSC 20x: NaCl 175 g/L, citrato de sodio 88.2 g/L, pH 7.0) y SDS al 0.1% a 42 °C por 20 min y dos lavados con SSC 0.1x y SDS al 0.1 % a 42 °C por 20 min. Estas soluciones fueron previamente calentadas a 42 °C. Las membranas se expusieron a película sensible a rayos X (XAR-5, Kodak), a -70 °C durante tiempos de 15 min a media hora. Se realizaron nuevos lavados en aquellas membranas que presentaron demasiada radiactividad. Se detectó la radiación emitida por la membrana con el contador Geiger, hasta obtener una emisión adecuada de 100-200 cpm.

### **5.2.9. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz**

#### **5.2.9.1. Preparación del inóculo**

Estas pruebas permitieron la evaluación de la capacidad de formación de

tumores de las cepas mutantes, silvestres y transformadas bajo estudio. Para estas pruebas de invernadero, se prepararon cultivos de células en fase exponencial de crecimiento en PDB a 28 °C y 200 rpm cultivadas durante 22 h. Después de centrifugar y lavar las células dos veces con agua destilada estéril, se resuspendieron en agua para obtener una suspensión con aproximadamente  $10^8$  células/mL y se contaron al microscopio con un hemacitómetro.

A partir de estas suspensiones concentradas de células, se tomaron alícuotas para la preparación de mezclas de cepas compatibles (cruzas). Cada cruzo fue una suspensión acuosa que contenía  $2.5 \times 10^6$  células/mL de cada cepa compatible. Para el caso de las cepas solopatogénicas, las cuales infectan por sí solas (no necesitan aparearse con otra cepa), la suspensión contenía  $2.5 \times 10^6$  células/mL en total. De esta manera, en vista de que una sola célula de una cepa solopatogénica es infecciosa, al igual que dos células compatibles deben aparearse para formar una unidad infecciosa, todas las suspensiones inoculadas a las plántulas de maíz contenían  $2.5 \times 10^6$  unidades infecciosas por mililitro.

En el caso de las cepas transformadas, las cruzas se hicieron mezclando cepas compatibles transformadas con el mismo vector y con el inserto *iaaL* en la misma orientación.

#### **5.2.9.2. Siembra e inoculación de plántulas**

La mezcla total de suelo en la que fue sembrada la variedad de maíz susceptible, consistió de suelo de hoja, suelo negro, suelo lama y mezcla Sunshine No. 3 (SunGro Horticulture Inc., Bellevue WA) en una proporción de 5:1:1:3 (v/v). A la mezcla total se le añadió fertilizante Triple-17-Plus (Happy Flower; BASF AG, Alemania) en una proporción 1:3000 (v/v) aproximadamente. La mezcla de suelo fue colocada en macetas de 20 cm de alto x 15 cm de diámetro. Se sembraron 10 semillas por maceta y se regaron con agua corriente diariamente. Al décimo día de sembradas fueron inoculadas con 100  $\mu$ L de la cruzo o cepa solopatogénica a ser probada. Para esta operación se utilizó una jeringa para insulina (Becton-Dickinson Plastipak) de 1 mL con aguja 26G x 1/2". La inoculación se realizó en el tallo de la planta a 1 cm de la superficie del suelo (Figura 9). Se inocularon en promedio 150 plantas por cada cruzo o cepa solopatogénica. La inoculación fue completamente al azar y sin conocimiento de la identidad de las cruzas/cepas inoculadas (experimento ciego). Posterior a la inoculación se dejaron sin regar durante 24 h; después se regaron por lo menos cada tercer día.



Figura 9. Inoculación de plántulas de maíz en pruebas de infectividad en invernadero.

### **5.2.9.3. Calificación de síntomas de infección**

Las plantas fueron evaluadas a los 14 días después de la inoculación. El grado de infección para cada planta fue calificado de acuerdo a una escala subjetiva modificada a partir del método de Barrett y col. (1993) para medir la severidad del ataque de *U. maydis* a plántulas de maíz. De acuerdo a esto, a cada planta se asignó un número según la siguiente escala: 0= no hay síntomas de infección, 1= producción de antocianinas (pigmento rojo), 2= agallas pequeñas y/o escasas en hojas y/o tallo, 3= agallas medianas y/o medianamente abundantes en hojas y/o tallo, 4= agallas grandes y/o muy abundantes en hojas y/o tallo, 5= planta muerta con síntomas severos de infección. La evaluación se realizó al azar y sin conocimiento de la identidad de las cruzas/cepas inoculadas en las plantas (experimento ciego). En un experimento, las plantas fueron evaluadas por tres diferentes evaluadores a objeto de conocer el efecto de este factor sobre las medias aritméticas de infectividad.

Estas evaluaciones de infectividad fueron comparadas con los datos de producción de AIA en cultivo *in vitro*, a fin de establecer si hay o no una relación entre tales parámetros.

### **5.2.10. Determinación de capacidad de sobrevivencia en agua**

La determinación de estas curvas tuvo como objetivo evaluar la capacidad de sobrevivencia de algunas de las cepas en condiciones mínimas en ausencia de medio de cultivo, como es probablemente el caso de las condiciones encontradas por las esporidias cuando son suspendidas en agua e inoculadas a plántulas de maíz durante las pruebas de infección en invernadero. Para ello se prepararon cultivos de células en fase exponencial de crecimiento en PDB a 28 °C y 200 rpm cultivadas durante 22 h. Después de centrifugar, eliminar el medio de cultivo, y lavar dos veces las células con agua destilada estéril, se resuspendieron en agua y se contaron al microscopio con un hemacitómetro. En base al conteo se hizo una dilución para obtener una suspensión con aproximadamente 2,000 células/mL. Esta suspensión fue mantenida a 25 °C durante por lo menos 10 h a partir del momento en que las células fueron suspendidas en agua por primera vez (tiempo cero). Se muestreó la suspensión cada 2 ó 3 h tomando alícuotas de 100 y 200 µL por duplicado cada una y sembrándolas en PDA, esparciendo con varilla de vidrio estéril. Las placas fueron incubadas en condiciones de rutina después de lo cual las colonias fueron contadas. Se calculó y expresó la viabilidad celular como  $\log_{10}$  de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro del cultivo original para luego

ser graficada contra el tiempo de suspensión en agua.

#### **5.2.11. Análisis de resultados**

Se hicieron análisis de varianza usando los paquetes estadísticos Statgraphics (Statistical Graphics System by Statistical Graphics Corporation, STSC, Inc., Rockville MD), o el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc., Cary NC) o el paquete S-Plus versión 4.5 (Mathsoft, Seattle WA) o el Paquete de Diseños Experimentales FAUANL versión 2.5 (Olivárez-Sáenz, 1994). Las pruebas de comparación de medias (prueba DMS, prueba de Duncan, prueba de Tukey, prueba de Student-Newman-Keuls) de tratamientos se realizaron en el paquete Microsoft Excel versiones 5.0 y 7.0 (Microsoft Corporation).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Obtención y análisis de mutantes AIA<sup>-</sup> de *Ustilago maydis*

#### 6.1.1. Determinación de la formulación del reactivo de Salkowski más adecuada para cuantificar AIA

Como primer paso para la cuantificación de los niveles de AIA producidos por las cepas silvestres, mutantes y transformadas de *U. maydis* a ser analizadas en el presente estudio, se escogió el reactivo de Salkowski del cual se obtuviera mejor coeficiente de correlación en la regresión lineal de absorbancia contra concentración de AIA. Las ecuaciones de regresión lineal simple obtenidas y sus correspondientes coeficientes de correlación para las curvas de calibración en caldo papa-dextrosa (PDB) conteniendo 0.1% (p/v) de L-triptofano con ambas formulaciones probadas (GW y PC) fueron las siguientes:

Ecuación 1) Reactivo GW:	$y = 0.0105 + 0.0320x$	$r = 0.9997$
Ecuación 2) Reactivo PC:	$y = 0.0387 + 0.0632x$	$r = 0.9980$

donde:  $y$  = Absorbancia a 530 nm  
 $x$  = Concentración de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ )  
 $r$  = Coeficiente de correlación

En base a estos resultados, el reactivo seleccionado para cuantificar AIA en cultivos en medio PDB con triptofano adicionado fue el GW (Gordon y Weber, 1951), el cual mostró un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9997 en el intervalo de concentración de 0 a 45  $\mu\text{g/mL}$ , previamente reportado como intervalo útil del reactivo (Gordon y Weber, 1951). El reactivo PC (Pilet y Chollet) mostró un coeficiente de correlación de 0.9980 en el intervalo de concentración de AIA de 0 a 20  $\mu\text{g/mL}$ , aunque su valor de  $r$  fue bajo a concentraciones mayores. Esto concordó con lo reportado previamente por Glickmann y Dessaux (1995) respecto al intervalo más útil del reactivo PC.

También se construyeron curvas de calibración con el reactivo GW en medio mínimo de Czapek-Dox líquido conteniendo 0.1% (p/v) de L-triptofano, debido a que el presente trabajo incluye determinaciones de Salkowski para cepas cultivadas en este medio. A continuación se muestra una de las ecuaciones de regresión lineal simple representativa de tales curvas de calibración:

Ecuación 3)  $y = 0.0049 + 0.0343x$   $r = 0.9992$

El coeficiente de correlación que se obtuvo en este caso fue de 0.9992 en el intervalo de concentración de AIA de 0 a 45 µg/mL, el cual se consideró adecuado para el análisis. En general, los coeficientes de correlación obtenidos en las regresiones para las curvas de calibración de los dos reactivos de Salkowski y los dos medios de cultivo considerados fueron altos (cerca de 1). Posteriormente, las concentraciones de AIA en las muestras analizadas fueron calculadas usando las ecuaciones de regresión obtenidas con el reactivo GW.

### **6.1.2. Curvas de crecimiento y de producción y estabilidad de AIA de cepas silvestres**

Entre los primeros análisis realizados, se determinaron los comportamientos de crecimiento y de producción de AIA en medio PDB con triptofano, en dos de las cepas silvestres de *Ustilago maydis* más utilizadas en los laboratorios que estudian este hongo. Los resultados se muestran en la Figura 10. Como es evidente, ambas cepas crecieron vigorosamente y de manera similar en este medio de cultivo, el cual es un medio complejo y uno de los más utilizados para el cultivo de hongos. Por otro lado, los niveles de AIA fueron cuantificables hasta las 24 h de cultivo, tiempo en el que el hongo se encuentra al final de la fase exponencial de crecimiento. Dichos niveles aumentaron rápidamente hasta alcanzar un máximo a las 48 h, después del cual disminuyeron dramáticamente hasta alcanzar niveles que representaron solo el 25% del nivel máximo mencionado. Se desconoce el motivo de esta disminución, aunque diversos autores han reportado la inestabilidad química del AIA y su degradación en presencia del oxígeno y la luz (Bandurski y col., 1995; Cohen, 1983).

En vista de lo anterior, en el mismo experimento se incluyeron matraces conteniendo PDB con triptofano y una cantidad conocida de AIA estándar similar a la máxima concentración de AIA alcanzada por los cultivos de las cepas (225 µg/mL). Dicha cantidad fue añadida al principio del período de incubación de los matraces (hora cero), a fin de observar los cambios en concentración durante el período de 168 horas. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 10, no se observó una disminución significativa en los niveles de AIA durante el período mencionado. Esto sugiere que el hongo es el responsable de la caída observada en los niveles de AIA y no la presencia de luz y oxígeno, probablemente mediante la generación de alguna(s) enzima(s) que degrada o transforma al AIA en

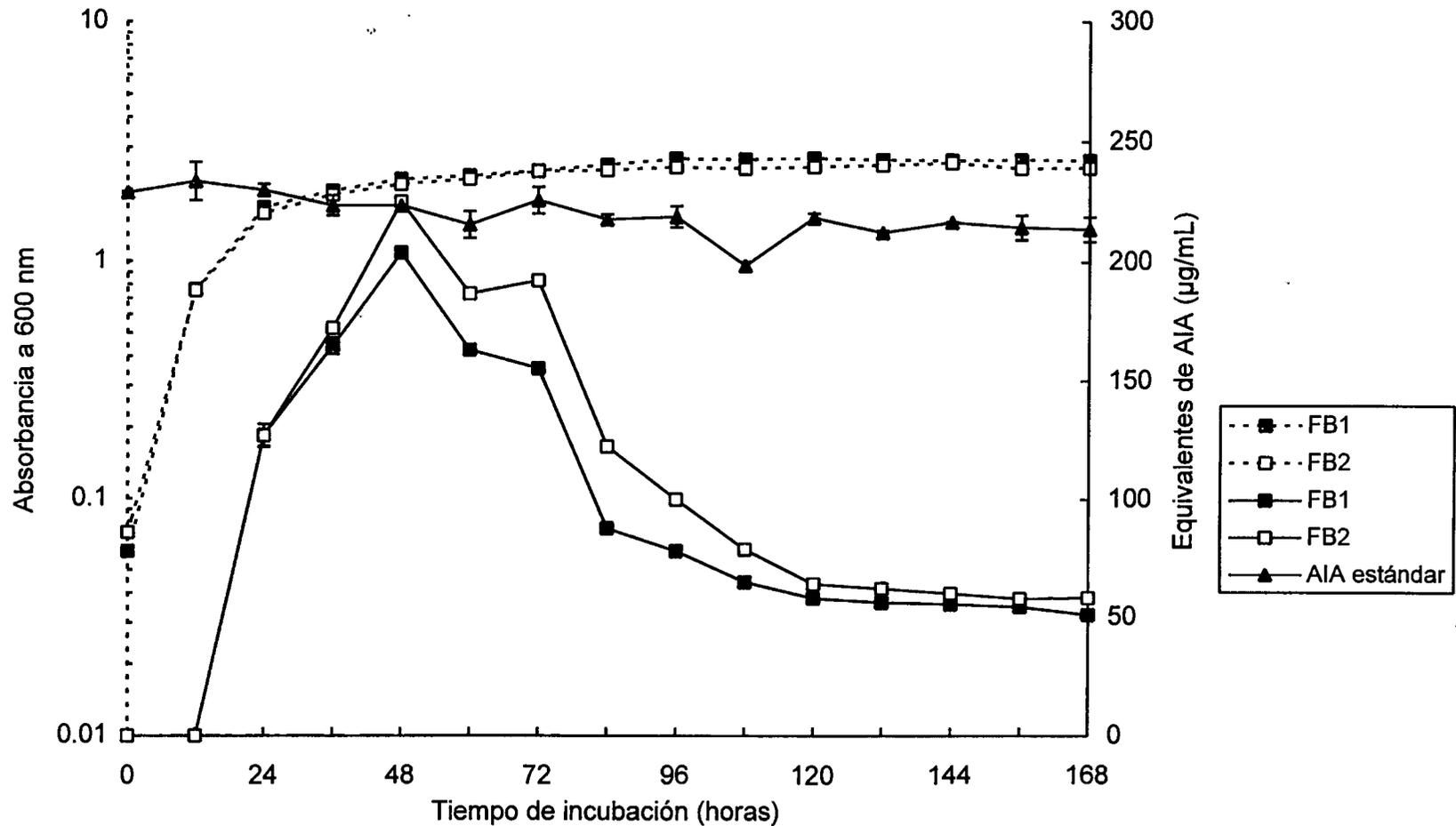


Figura 10. Curvas de crecimiento y de producción y estabilidad de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas silvestres FB1 y FB2 de *Ustilago maydis*, cultivadas en medio PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA se cuantificaron mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

compuesto(s) no detectables por la reacción de Salkowski. Es probable que el AIA desaparezca por algún mecanismo de oxidación o conjugación. Al respecto, se sabe que algunas oxidasas y peroxidasas no específicas pueden transformar el AIA en una variedad de productos de oxidación (Bandurski y col., 1995; Cohen, 1983), aunque se desconoce si *U. maydis* produce enzimas de este tipo en cultivo *in vitro*. Adicionalmente, se ha reportado y documentado ampliamente una diversidad de conjugados de AIA en plantas y microorganismos (Kleczkowski y Schell, 1995), aunque ninguno ha sido reportado en *U. maydis*.

La Figura 11 muestra las curvas de crecimiento y de producción de AIA para las cepas silvestres FB2, 001 y 002 en medio PDB con triptofano. Según el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan, no hubo diferencias significativas en crecimiento de las 24 a las 72 h de incubación entre las tres cepas ( $p < 0.05$ ). De las 96 a las 168 h de incubación, las cepas FB2 y 001 no mostraron diferencias significativas en su crecimiento; el crecimiento de la cepa 002 fue ligeramente mayor que el de las otras dos cepas.

Todas las cepas mostraron altos niveles de producción de AIA. El nivel máximo en la cepa FB2 fue observado a las 72 h, con un valor de 262.4  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para las cepas 001 (245.7  $\mu\text{g/mL}$ ) y 002 (233.6  $\mu\text{g/mL}$ ) fue a las 96 h de cultivo. No hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el nivel de AIA máximo producido por la cepa FB2 y el máximo alcanzado por la cepa 001 en el medio de cultivo utilizado (PDB con triptofano). De modo similar, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los máximos de las cepas 001 y 002.

En base a estos análisis de producción de AIA *in vitro*, y a la previamente reportada (Barrett y col., 1993; Banuett y Herskowitz, 1989) capacidad de las cepas FB1, FB2, 001 y 002 de producir infección en plantas de maíz al ser apareadas en las combinaciones (cruzas) adecuadas (FB1 x FB2 y 001 x 002), se decidió utilizar las cepas FB1 y FB2 para los experimentos de mutagénesis, a objeto de obtener mutantes que mostraran capacidad disminuida de producir AIA *in vitro* (fenotipo AIA<sup>-</sup>) a partir de ellas.

### **6.1.3. Mutagénesis y selección de mutantes AIA<sup>-</sup>**

En un experimento preliminar se sometió a mutagénesis con luz UV a la cepa FB1. Por otro lado, la cepa FB2 fue sometida a tres métodos de mutagénesis. El primero involucró solo irradiación UV, el segundo consistió en mutagénesis química usando ácido clofíbrico (ACF), y en el tercero se sometió primero a

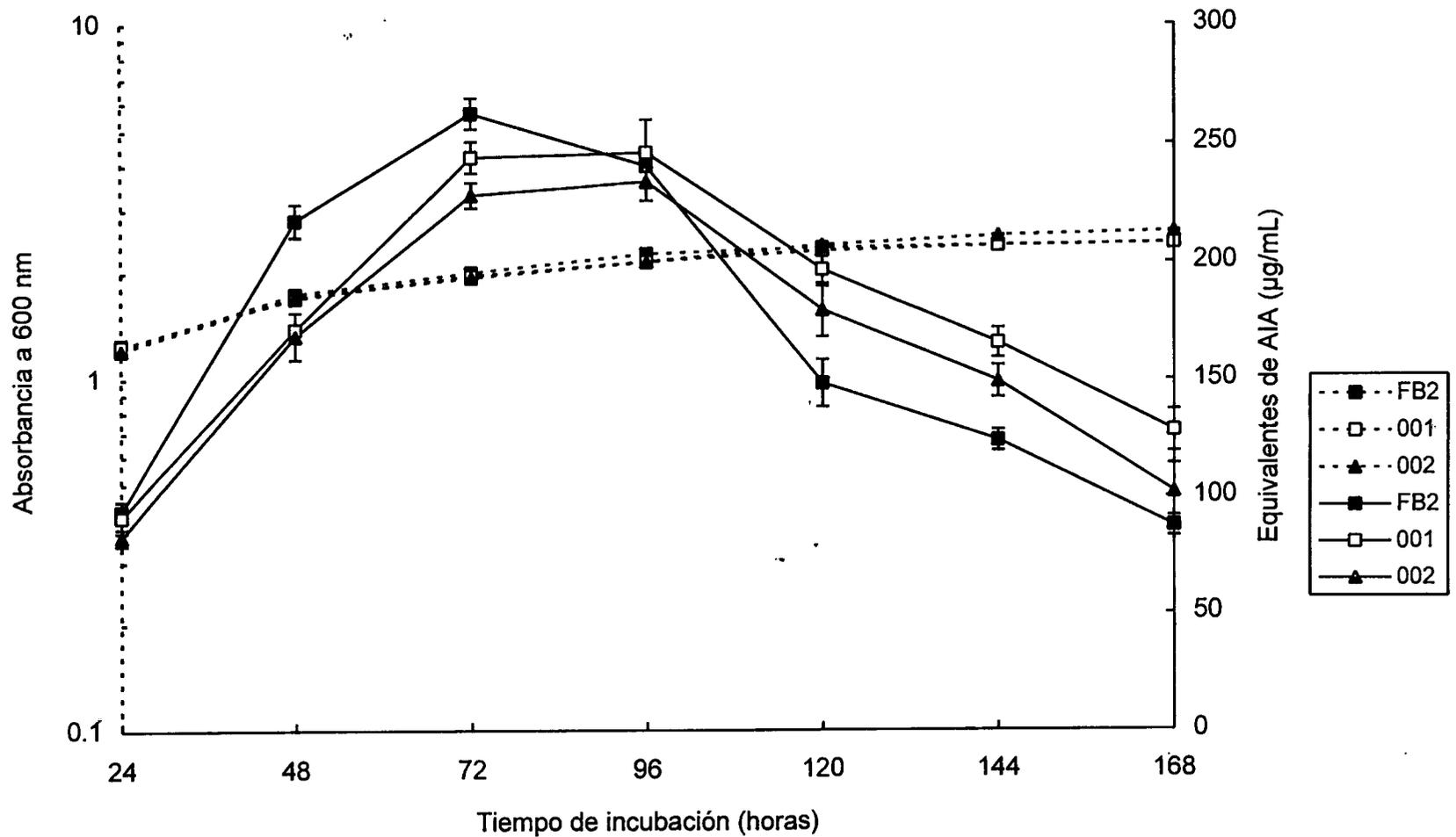


Figura 11. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas silvestres FB2, 001 y 002 de *Ustilago maydis*, cultivadas en medio PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA se cuantificaron mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

irradiación UV para luego plaquear las células sobrevivientes sobre cajas de medio con ACF. El Cuadro 5 resume los principales datos del proceso de mutagénesis y selección de mutantes AIA<sup>-</sup> llevado a cabo. A raíz de los pasos de selección realizados mediante el reactivo de Salkowski, de los aislados derivados de la silvestre FB1, solo dos (aislados 1 y 11) fueron seleccionados como posibles mutantes AIA<sup>-</sup>, y uno (aislado 25) como AIA<sup>++</sup> (sobreproductor de AIA). De los aislados obtenidos de FB2 por irradiación UV, ninguno fue considerado como posible mutante AIA<sup>-</sup> o AIA<sup>++</sup>. Por otro lado, de los aislados de FB2 resultantes de mutagénesis con ACF, solo dos (aislado 56 y 103) parecieron ser mutantes AIA<sup>-</sup> y ninguno AIA<sup>++</sup>. Finalmente, de los aislados de FB2 irradiados y tratados con ACF, solo uno (aislado 130) mostró un fenotipo AIA<sup>-</sup> y ningún aislado fue considerado AIA<sup>++</sup>.

Se analizaron de manera preliminar las curvas de crecimiento y de producción *in vitro* de AIA de los seis aislados considerados mutantes (datos no mostrados). De éstos, los aislados 1, 11 y 25 mostraron niveles de AIA similares a los alcanzados por las cepas silvestres de donde fueron obtenidos, por lo que se descartó su uso en posteriores análisis. Sin embargo, los aislados 56, 103 y 130 mostraron niveles significativamente disminuidos de AIA respecto a los producidos por la cepa FB2, de donde se originaron dichas mutantes. Por lo tanto, se decidió designar a partir de este punto a los aislados 56, 103 y 130 como cepas *udi1*, *udi2* y *udi3*, respectivamente, en vista de que son mutantes de *Ustilago maydis* que muestran una deficiente producción *in vitro* de ácido indol-3-acético. Las principales características de estas mutantes, y otras obtenidas más adelante en el estudio, se detallan en el Cuadro 6.

Tomando en cuenta los números iniciales de células de FB2 usados en los métodos de mutagénesis que resultaron exitosos (Cuadro 5), la probabilidad observada de obtener una mutante AIA<sup>-</sup> por el método del ACF fue de alrededor de  $9.5 \times 10^{-9}$ , mientras que para una mutante obtenida por irradiación UV más ACF fue de  $1.4 \times 10^{-9}$ . Los resultados obtenidos muestran que la mutagénesis con ACF es una técnica útil para el aislamiento de mutantes de *U. maydis* con producción disminuida de AIA. Las probabilidades de hallazgo de una mutante AIA<sup>-</sup> de *U. maydis* fueron similares al valor reportado ( $1 \times 10^{-8}$ ) por Yamada y col. (1990b) para la generación de mutantes AIA<sup>-</sup> de *Taphrina wiesneri* y *T. deformans* usando el mismo método. Las tres cepas mutantes AIA<sup>-</sup> *udi1*, *udi2* y *udi3* obtenidas en el presente trabajo fueron caracterizadas como se describe en párrafos subsecuentes.

Cuadro 5. Mutagénesis y selección de mutantes AIA<sup>-</sup> de *Ustilago maydis*.

Pasos Cepas	Número de células o aislados		
	Radiación ultravioleta (UV)	Ácido clofíbrico (ACF)	UV + ACF
<b>Mutagénesis</b>			
Células iniciales			
FB1	~3 x 10 <sup>4</sup>	-----	-----
FB2	~5 x 10 <sup>4</sup>	~2.1 x 10 <sup>8</sup>	~7 x 10 <sup>8</sup>
<b>Selección (Salkowski)</b>			
Aislados analizados			
FB1	945	-----	-----
FB2	1410	658	376
<b>Mutantes obtenidas</b>			
FB1	0	-----	-----
FB2	0	2	1
<b>% de sobrevivencia</b>			
FB1	~10	-----	-----
FB2	~10	~3 x 10 <sup>-4</sup>	~5 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Probabilidad de mutación AIA<sup>-</sup></b>			
	-----	~9.5 x 10 <sup>-9</sup>	~1.4 x 10 <sup>-9</sup>

Cuadro 6. Cepas mutantes de *Ustilago maydis* obtenidas en este estudio.

Cepas mutantes	Cepa(s) progenitora(s)	Técnica de mutagénesis <sup>1</sup>	Fenotipo / genotipo relevante <sup>2</sup>
<i>udi1</i>	FB2	ACF	AIA <sup>-</sup> nula (0), Met <sup>-</sup> , <i>a2b2</i>
<i>udi2</i>	FB2	ACF	AIA <sup>-</sup> parcial (30), Ade <sup>-</sup> , <i>a2b2</i>
<i>udi3</i>	FB2	UV+ACF	AIA <sup>-</sup> parcial (30), Ade <sup>-</sup> , <i>a2b2</i> (defectuosa)
<i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> <i>a1b1</i> )	<i>udi1</i> x FB1		AIA <sup>-</sup> parcial (10), Met <sup>-</sup> parcial, <i>a1b1</i>
<i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> <i>a2b2</i> )	<i>udi1</i> x FB1		AIA <sup>-</sup> parcial (10), Met <sup>-</sup> parcial, <i>a2b2</i>
<i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> <i>a1b2</i> )	<i>udi1</i> x FB1		AIA <sup>-</sup> parcial (10), Met <sup>-</sup> parcial, <i>a1b2</i>
<i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> <i>a2b1</i> )	<i>udi1</i> x FB1		AIA <sup>-</sup> parcial (10), Met <sup>-</sup> parcial, <i>a2b1</i>
<i>udi1</i> ( <i>a1b1</i> )50	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>-</sup> parcial (50), Met <sup>+</sup> , <i>a1b1</i>
<i>udi1</i> ( <i>a1b1d</i> )50	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>-</sup> parcial (50), Met <sup>+</sup> , <i>a1b1</i> (defectuosa)
<i>udi1</i> ( <i>a1bx</i> )50	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>-</sup> parcial (50), Met <sup>+</sup> , <i>a1bx</i>
<i>udi1</i> ( <i>a1bx</i> )175	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>+</sup> (175), Met <sup>+</sup> , <i>a1bx</i>
<i>udi1</i> ( <i>a2b1</i> )100	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>+</sup> (100), Met <sup>+</sup> , <i>a2b1</i>
<i>udi1</i> ( <i>a2b1</i> )135	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>+</sup> (135), Met <sup>+</sup> , <i>a2b1</i>
<i>udi1</i> ( <i>a2b1</i> )175	<i>udi1</i> x 002		AIA <sup>+</sup> (175), Met <sup>+</sup> , <i>a2b1</i>

<sup>1</sup> ACF= Ácido clofibrico; UV= Radiación ultravioleta.

<sup>2</sup> Los números entre paréntesis representan el porcentaje aproximado de producción máxima de ácido indol-3-acético (AIA) sintetizado *in vitro* por la cepa, con respecto al nivel máximo producido por la cepa silvestre FB2.

#### 6.1.4. Crecimiento de las mutantes AIA<sup>-</sup> en medio mínimo de Czapek-Dox y en caldo papa-dextrosa

De las tres cepas mutantes obtenidas, *udi1* no pudo crecer en medio mínimo de Czapek-Dox sólido. Solo *udi2* y *udi3* pudieron crecer en ese medio, aunque produjeron colonias de menor tamaño respecto a la silvestre FB2 (Figura 12). Además, la mutante *udi3* presentó dos tipos de colonias en dicho medio, las cuales fueron designadas como *udi3*PQ (colonias pequeñas y filamentosas/miceliales) y *udi3*GR (colonias grandes y planas/no miceliales). Se muestreó una colonia de cada tipo y se mantuvieron y analizaron como cepas diferentes.

En vista del carácter de auxotrofia total o parcial que parecían presentar las cuatro cepas mutantes AIA<sup>-</sup> (*udi1*, *udi2*, *udi3*PQ y *udi3*GR), se probó el efecto de adición de diversos suplementos al medio mínimo de Czapek-Dox sólido sobre su crecimiento. Como resultado la mutante *udi1* mostró un crecimiento fuertemente favorecido por la adición de L-metionina al medio mínimo (Figura 13). Esto indicó que dicha mutante poseía también una auxotrofia para metionina (fenotipo Met<sup>-</sup>). Las otras tres mutantes en general no respondieron a los suplementos excepto ligeramente a la adenina, y solo crecieron pocas colonias pequeñas a partir del volumen de la dilución inoculada (aproximadamente 10<sup>5</sup> células en total). A este respecto, resulta interesante notar que las mutantes AIA<sup>-</sup> de *T. wiesneri* y *T. deformans* obtenidas por Yamada y col. (1990b) resultaron ser auxotróficas para purinas (adenina y guanina).

Se observaron morfologías esporidiales interesantes cuando las mutantes fueron cultivadas en caldo papa-dextrosa (PDB) (Figura 14). Las cepas silvestres como la FB2 generalmente crecen de manera levaduriforme, reproduciéndose típicamente por gemación (Figura 14A). Sin embargo, la mutante *udi1* (Figura 14B) y la *udi2* (no mostrada), ambas generadas independientemente por mutagénesis con ACF, crecieron sin mostrar una gemación evidente, como si hubieran perdido esta capacidad y se estuvieran reproduciendo por fisión. Por otro lado, la mutante *udi3*PQ mostró una morfología similar a la de la cepa FB2, mientras que la *udi3*GR (Figura 14C) fue diferente, presentando células muy alargadas y de apariencia pseudomicelias. Hasta la fecha se desconoce la razón de dichas morfologías atípicas, sugiriéndose que los tratamientos de mutagénesis, además de haber causado la mutación AIA<sup>-</sup> y las auxotrofías, posiblemente afectaron también los mecanismos involucrados en la división celular y la citocinesis que hace posible la separación de las células madre e hija en cada ciclo de división. Aunque tales

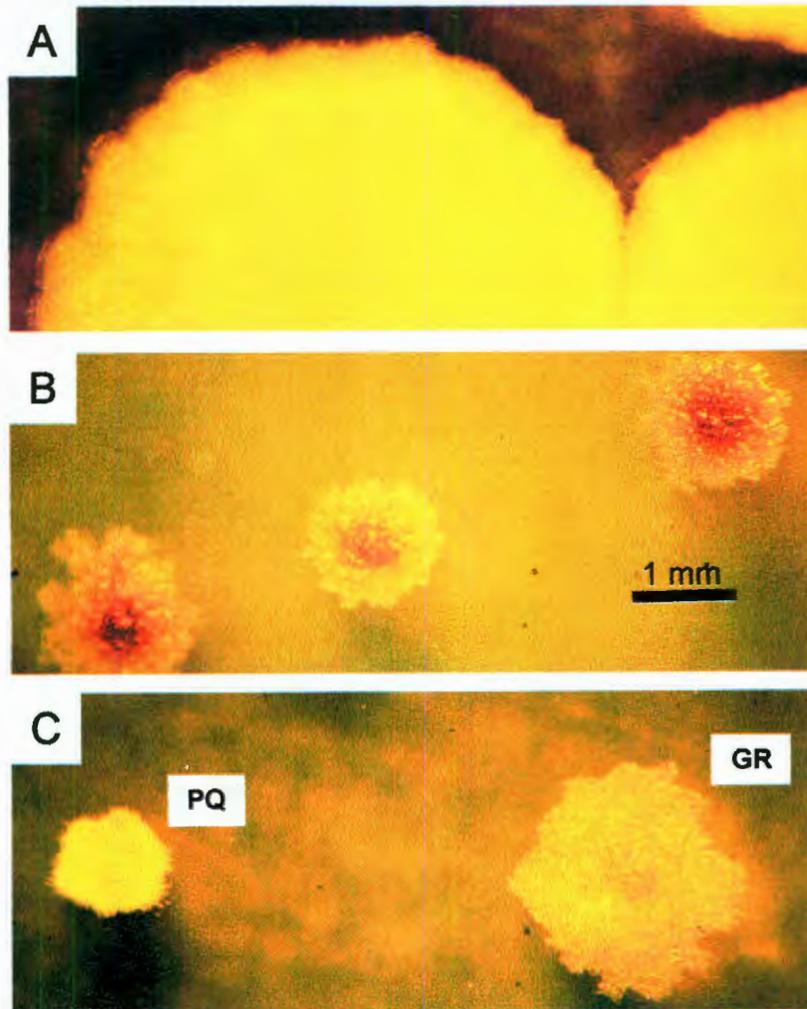


Figura 12. Morfología de colonias de la cepa silvestre FB2 (A) y de las cepas mutantes *AIA<sup>-</sup> udi2* (B) y *udi3* (C) de *Ustilago maydis*, cultivadas en medio mínimo de Czapek-Dox sólido durante 16 días a 30 °C. PQ: Mutante *udi3* de colonias pequeñas; GR: Mutante *udi3* de colonias grandes.

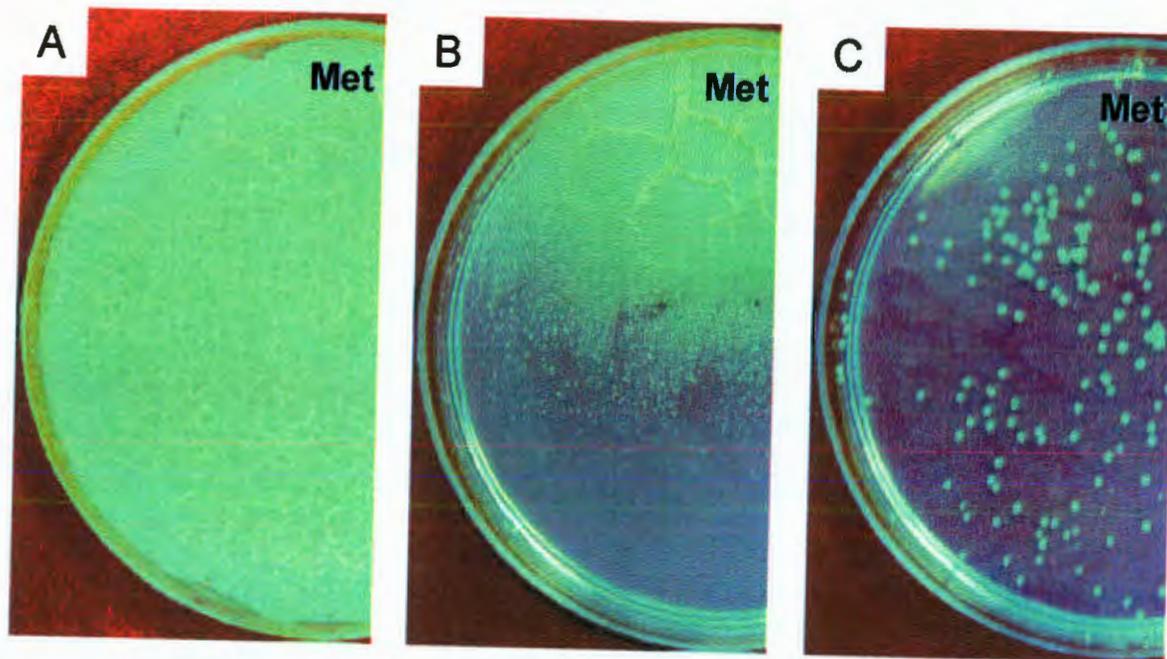


Figura 13. Crecimiento de la cepa silvestre FB2 (A) y de las cepas mutantes  $AIA^-$  *udi1* (B) y *udi2* (C) de *Ustilago maydis* en medio mínimo de Czapek-Dox sólido suplementado con L-metionina. Met indica el punto de la caja con medio de cultivo en el que se adicionaron 2 mg de cristales del aminoácido.

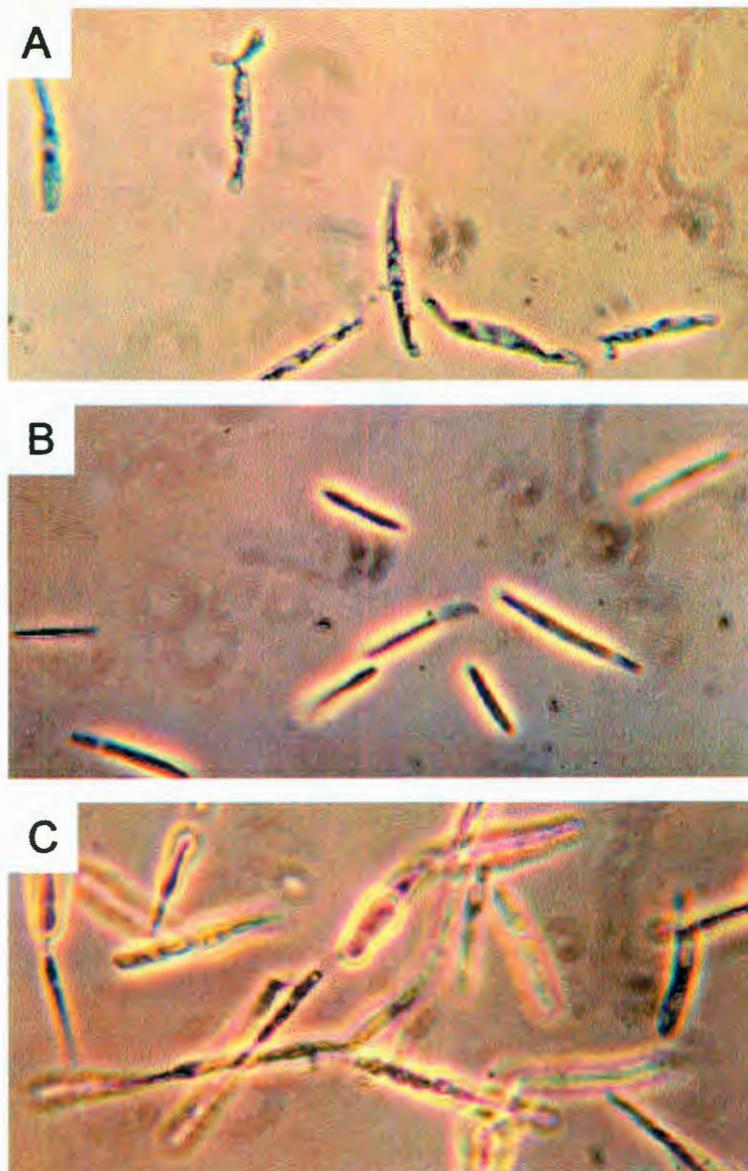


Figura 14. Morfología de esporidias de la cepa silvestre FB2 (A) y de las cepas mutantes  $AIA^- udi1$  (B) y  $udi3GR$  (C) de *Ustilago maydis*, cultivadas en caldo papa-dextrosa durante 48 h a 30 °C y 200 rpm. Las células fueron teñidas con azul de tripano y se usó un microscopio de luz con contraste de fases; magnificación 100x.

procesos han sido ampliamente estudiados usando como modelo el ascomiceto *Schizosaccharomyces pombe* (Hirano y Yanagida, 1989), son pocos los reportes de mutantes de *Ustilago* afectadas en la división celular y citocinesis (Gold y col., 1994; Barrett y col., 1993), por lo que sería interesante explorar la factibilidad de usar las mutantes obtenidas en el presente trabajo como modelos de estudio de los mecanismos de división celular de este basidiomiceto.

#### 6.1.5. Crecimiento y producción *in vitro* de AIA por las cepas mutantes AIA<sup>-</sup>

La Figura 15 muestra el crecimiento y los niveles de AIA (determinados por el método de Salkowski) producidos por las cepas mutantes AIA<sup>-</sup> en comparación con la cepa silvestre FB2, que les dio origen. Todas las cepas crecieron de manera similar en el medio PDB con triptofano. Según el análisis de varianza y la prueba de Duncan, a los tiempos de incubación de mayor producción (72-120 h) las cuatro cepas mutantes produjeron niveles de AIA significativamente menores ( $\alpha = 0.05$ ) que los de la silvestre FB2. De hecho, los niveles de AIA producidos por la cepa *udi1* no fueron detectables, por lo que se consideró a esta cepa como una mutante nula para producción de AIA. Las otras tres cepas produjeron entre 15 y 30% de los niveles máximos alcanzados por la silvestre FB2. En general, la reproducibilidad de los análisis de Salkowski fue buena; a los tiempos de incubación de 72 a 120 h, los coeficientes de variación fueron 0.9-6.8% para la cepa silvestre FB2, 1.1-3.0% para la cepa *udi2*, 8.6-19.9% para la cepa *udi3PQ*, y 12.5-13.5% para la cepa *udi3GR*.

En el Cuadro 7 se presentan los niveles máximos de AIA cuantificados por el método de Salkowski, así como por el procedimiento confirmatorio de HPLC. Además se resumen las características importantes ya mencionadas de las cepas. En general, hubo cierta concordancia entre las estimaciones de AIA hechas con ambos métodos, aunque los niveles determinados por HPLC fueron por lo general menores que los de Salkowski. El mayor nivel de AIA analizado por HPLC fue observado para la cepa FB2, el menor nivel detectable fue el de la mutante *udi3GR*, mientras que para la mutante nula *udi1* no fue detectable. En vista de que la mutante *udi3GR* produjo niveles de AIA significativamente menores que los de la cepa *udi3PQ*, según los resultados de HPLC, el dimorfismo colonial podría estar indicando que hay mutaciones diferentes en estas cepas que afectan la morfología colonial y la producción de AIA. La reproducibilidad de los análisis de HPLC también fue buena, con coeficientes de variación que fueron de 3.2% (mutante *udi3GR*) a 17.7% (silvestre FB2).

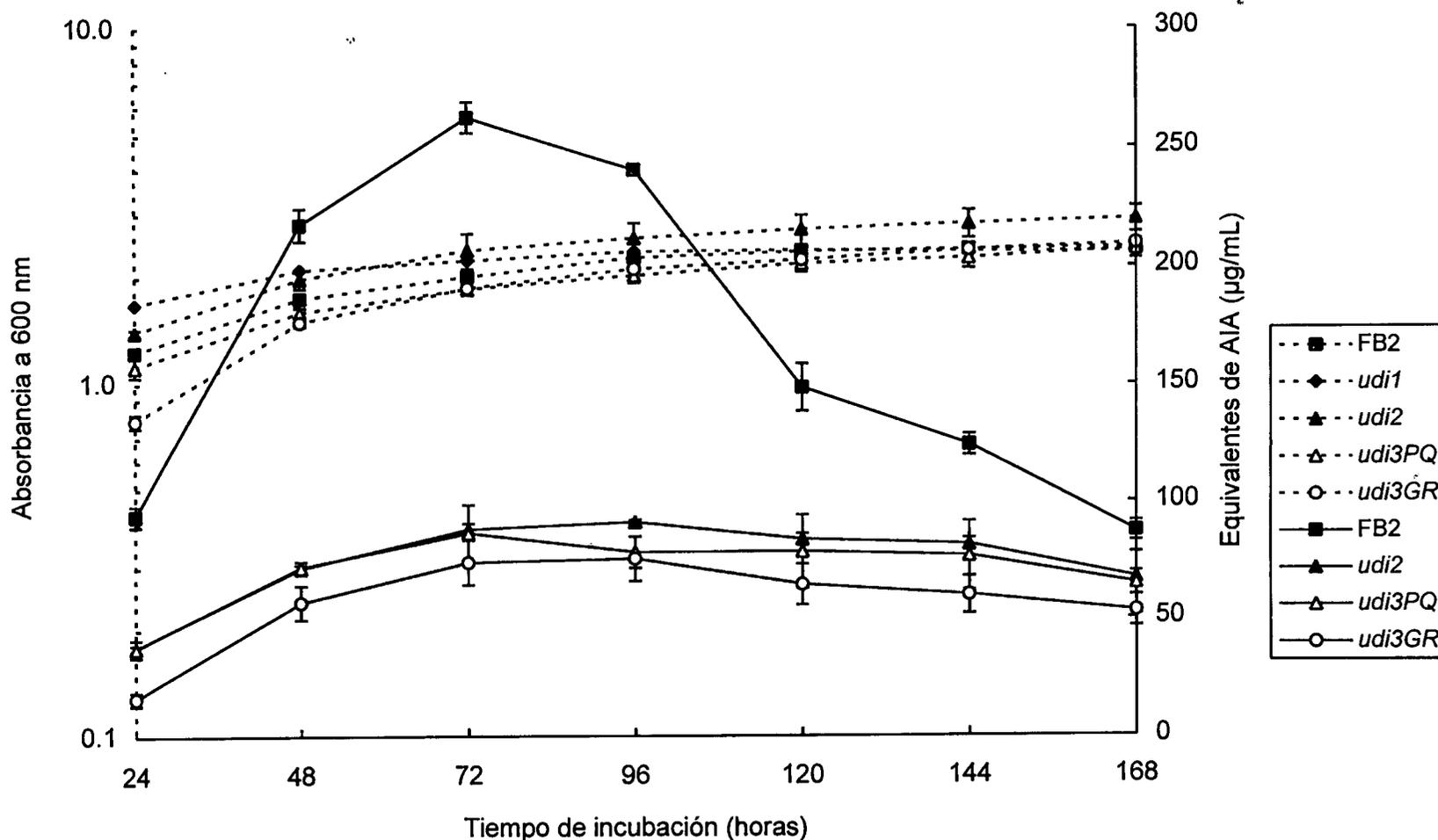


Figura 15. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepa silvestre FB2, y de las cepas mutantes *udi1*, *udi2*, *udi3PQ* y *udi3GR* de *Ustilago maydis*, cultivadas en medio PDB suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA se cuantificaron mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Cuadro 7. Niveles máximos de ácido indol-3-acético (AIA) producidos por cepas silvestres y mutantes de *U. maydis*, evaluados mediante dos técnicas diferentes.

Cepa	Derivación <sup>2</sup>	Tiempo de incubación (h)	Concentración de AIA (µg/ml)		Morfología colonial <sup>1</sup>		Esporidias
			Salkowski <sup>3</sup>	HPLC <sup>4</sup>	Tamaño (mm)	Forma	
FB2	Silvestre	72	262.3 ± 6.5	124.0 ± 22.0	4-5	Plana	Con gemación
<i>udi1</i>	ACF	--	No detectable		Auxotrofia a metionina		Sin gemación
<i>udi2</i>	ACF	96	90.8 ± 1.0	26.3 ± 3.3	1.5-2	Plana	Sin gemación
<i>udi3PQ</i>	UV+ACF	72	86.3 ± 12.0	92.8 ± 8.6	1-2	Miceliar	Similares a FB2
<i>udi3GR</i>	UV+ACF	96	75.3 ± 9.4	19.3 ± 6.2	2-3	Plana	Alargadas

<sup>1</sup> La morfología colonial fue evaluada después de incubar por 16 días a 30°C en medio mínimo de Czapek-Dox sólido; la morfología esporidial se evaluó en caldo papa-dextrosa después de incubar por 48 h a 30°C a 200 rpm.

<sup>2</sup> ACF: Mutagénesis con ácido clofíbrico; UV: Mutagénesis con radiación ultravioleta.

<sup>3</sup> Se muestran medias y desviaciones estándar de cuatro repeticiones.

<sup>4</sup> Se muestran medias y desviaciones estándar de tres repeticiones.

Las diferencias entre los niveles cuantificados por ambos métodos ya han sido reportadas previamente (Crozier y col., 1988) al analizar niveles de AIA en cultivos de *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*. Es probable que las diferencias observadas se deban, en parte, a la presencia de otros compuestos indólicos presentes en los cultivos y que dan reacción con el método de Salkowski pero no son cuantificados en el pico de AIA por HPLC. A este respecto, se ha reportado que el reactivo de Salkowski no es específico para AIA, reaccionando también con igual especificidad con el ácido indol-3-pirúvico (AlPir), y con menor especificidad (20%) con la indol-3-acetamida (Glickmann y Dessaux, 1995). Además, se ha observado que el AlPir también puede estar presente en cultivos de *U. maydis* (Basse y col., 1996; Navarre, 1990) y que es un intermediario en la biosíntesis de AIA en *U. maydis* (Basse y col., 1996). Por otro lado, las diferencias entre métodos también se pueden deber en parte a pérdida de AIA durante la preparación de la muestra para el análisis de HPLC. Aunque se han observado recuperaciones de AIA estándar de alrededor del 80%, dichas recuperaciones pueden variar de una muestra a otra aún cuando se hace lo posible por manipular las muestras de la misma forma.

Como conclusión hasta este punto, se logró generar cepas de *Ustilago maydis* que muestran una producción disminuida de AIA *in vitro*. Esto aparentemente representa el primer reporte en el que se logra generar, caracterizar y mantener tales mutantes en este hongo. Anteriormente, Basse col. (1996) reportaron la generación de mutantes de *U. maydis* por reemplazo de un gen que codifica una IAAld deshidrogenasa, la cual convierte IAAld en AIA en *U. maydis*. Sin embargo, sus mutantes no presentaron capacidad disminuida de sintetizar AIA a partir de triptofano en cultivo *in vitro*. Esto parece indicar que las mutantes obtenidas en el presente trabajo involucran mutación(es) en gen(es) diferente(s) al de la IAAld deshidrogenasa. Por lo tanto, según los resultados anteriormente descritos, se decidió analizar en mayor profundidad a las cepas mutantes *udi1*, *udi2* y *udi3GR* en experimentos posteriores.

#### **6.1.6. Pruebas de apareamiento *in vitro***

Se determinó la capacidad de las mutantes AIA<sup>-</sup> de aparearse en medio de cultivo *in vitro* con la cepa 002, la cual tiene un tipo de apareamiento *a1b1*, y es compatible con el tipo de la cepa FB2 (*a2b2*), que les dio origen. Como se aprecia en la Figura 16, las cepas *udi1* y *udi2* no tuvieron problemas para formar el micelio dicariótico con la cepa compatible, mientras que la mutante *udi3GR* dio una

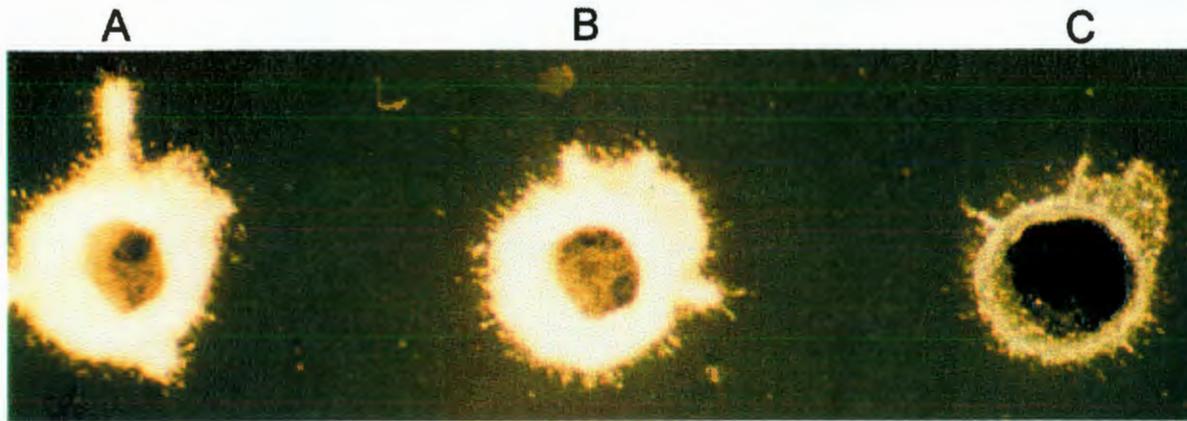


Figura 16. Pruebas de apareamiento *in vitro* de las cepas mutantes AIA<sup>-</sup> *udi1* (A), *udi2* (B) y *udi3GR* (C) de *Ustilago maydis*. El ensayo se hizo en medio doble completo de Holliday (1974) usando la cepa 002 para el apareamiento.

reacción disminuida. Esto sugirió que las dos primeras mutantes mencionadas no estaban dañadas en sus genes de apareamiento y podrían ser infectivas en plantas de maíz al cruzarlas con una cepa compatible. Por otro lado, *udi3GR* parecía tener problemas para aparearse lo cual podría traducirse en una pobre capacidad infectiva en planta. En vista de que la mutante *udi1* había mostrado una producción nula de AIA y de que parecía tener una auxotrofia ( $\text{Met}^-$ ) más simple que las otras mutantes, se decidió cruzarla, en un experimento preliminar, con la cepa silvestre FB1 (*a1b1*), inoculando la crucea en plántulas de maíz.

#### **6.1.7. Obtención y selección de cepas progenie AIA<sup>-</sup> compatibles**

El propósito de cruzar la mutante *udi1* con la silvestre FB1 fue el de generar progenie entre la cual se encontraran aislados que portaran la mutación AIA<sup>-</sup> *udi1* y que tuvieran tipos de apareamiento compatibles. Además también se pretendía que los aislados AIA<sup>-</sup> compatibles seleccionados fueran prototróficos, es decir que ya no llevaran la auxotrofia  $\text{Met}^-$  presente en la mutante *udi1*. Esto permitiría hacer cruces mutante x mutante y mutante x silvestre a fin de observar el efecto de solamente la mutación AIA<sup>-</sup> sobre la capacidad infectiva de las cruces en plántulas de maíz.

De un total de 64 plántulas inoculadas, 4 resultaron muertas por síntomas de infección, y 16 presentaron agallas grandes, algunas en la base del tallo como la que se muestra en la Figura 17. Las restantes presentaron síntomas más leves. Esto mostró que la mutante *udi1* fue infectiva al ser cruzada con la silvestre FB1. Esto es consistente con reportes en los que se menciona la capacidad infectiva de mutantes auxotróficas al ser cruzadas con una silvestre (Barrett y col., 1993).

Las teliosporas resultantes de la infección fueron germinadas y la progenie esporidial resultante fue lavada, diluida y sembrada en medio mínimo de Czapek-Dox sólido a objeto de obtener colonias esporidiales aisladas. En la Figura 18 se presenta una muestra de las colonias obtenidas. Básicamente se observaron colonias de diámetros designados como grande, mediano y pequeño, las cuales representaron el 36.3%, 29.4% y 34.3%, respectivamente, de un total de 1,939 colonias. Esto parece indicar que la auxotrofia segregó de tal manera que sugiere que hay más de un locus involucrado en ella.

En vista de lo anterior, se muestrearon 184 colonias de cada tamaño para hacer microcultivos (100  $\mu\text{L}$ ) en placas de microtitulación con PDB con triptofano, en las mismas condiciones en que se prepararon para la selección inicial de mutantes AIA<sup>-</sup>. De cada microcultivo se tomó una alícuota y se mezcló con dos

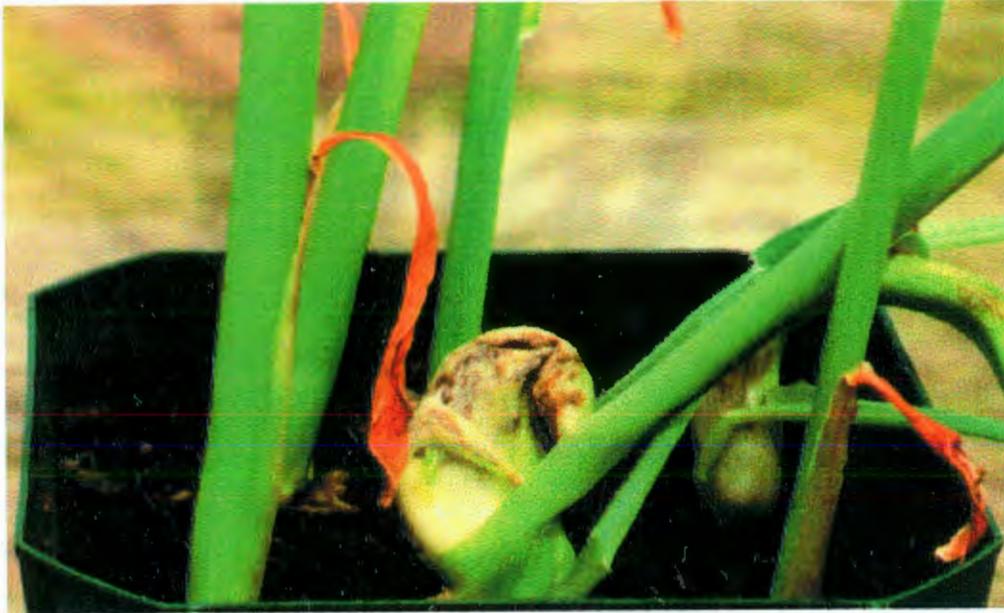


Figura 17. Agallas en tallos de plántulas de maíz producidas por la cruce de la cepa silvestre FB1 (AIA<sup>+</sup>) con la cepa mutante *udi1* (AIA<sup>-</sup>) de *Ustilago maydis*.

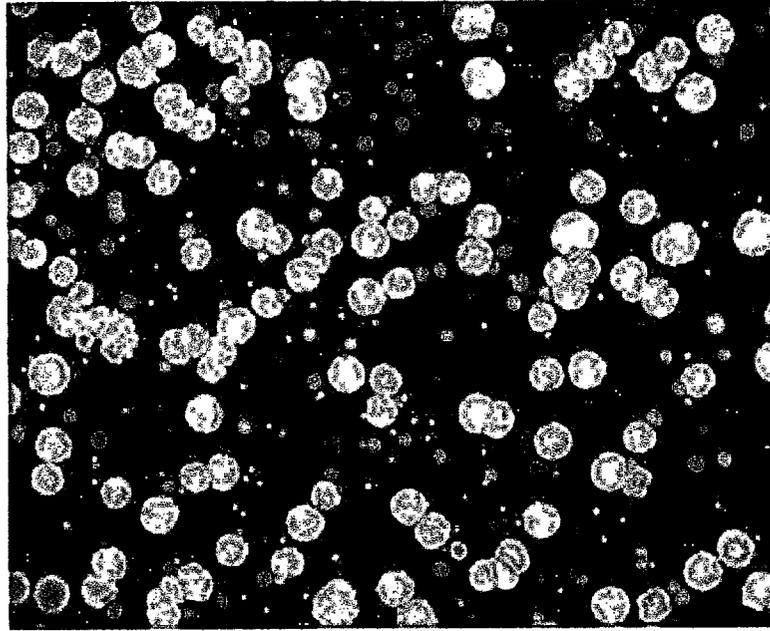


Figura 18. Colonias esporidiales progenie de la cruce de la cepa silvestre FB1 ( $AIA^+$ ) con la cepa mutante *udi1* ( $AIA^-$ ) de *Ustilago maydis*, cultivadas en medio mínimo de Czapek-Dox sólido durante 72 h a 30 °C.

volúmenes de reactivo de Salkowski para seleccionar las mutantes AIA<sup>-</sup>. Como se aprecia en la Figura 19, se incluyeron la cepa FB2 como control positivo, y la mutante *udi1* y el medio sin inóculo como controles negativos. Puede verse que la cepa *udi1* da un color amarillento en la prueba, consistente con su fenotipo AIA<sup>-</sup>. Asimismo, casi ningún aislado de colonia grande o mediano mostró una reacción de color rojo pálido. Es de hacer notar que casi todas los aislados de colonias pequeñas mostraron una reacción de Salkowski poco intensa, lo cual indicó que la mutación AIA<sup>-</sup> segregó ligada a la auxotrofia Met<sup>-</sup>. Cabe recalcar que algunos de los aislados de colonia pequeña presentaron color rojo intenso, lo cual indicó que el fenotipo AIA<sup>+</sup> segregó hacia alguna de las auxótrofas Met<sup>-</sup>. Esto sugirió que si bien la mutación AIA<sup>-</sup> parecía estar ligada a Met<sup>-</sup>, ambas eran separables, ya que había algunas colonias Met<sup>-</sup> que parecían ser AIA<sup>+</sup>. Del mismo modo, cabría esperar entre la progenie cepas que fueran Met<sup>+</sup> (colonias grandes) y AIA<sup>-</sup>. Posiblemente la ocurrencia de estas cepas se daba con baja frecuencia y por ello no fueron detectadas en las muestras analizadas.

De las colonias muestreadas y analizadas, se seleccionaron seis aislados de colonia pequeña (Met<sup>-</sup>) por presentar las reacciones de Salkowski más débiles. Además a estos aislados se les determinó su tipo de apareamiento como ya se describió en la sección de Materiales y Métodos. De los seis aislados, se seleccionaron los cuatro que poseían los cuatro diferentes tipos de apareamiento esperados posibles. En vista de que estos aislados eran portadores de la auxotrofia Met<sup>-</sup> y de la mutación *udi1*, y de que diferían en sus tipos de apareamiento, se les designó como cepas *udi1*(Met<sup>-</sup> *a1b1*), *udi1*(Met<sup>-</sup> *a2b2*), *udi1*(Met<sup>-</sup> *a1b2*), y *udi1*(Met<sup>-</sup> *a2b1*), y se decidió analizarlas en análisis posteriores. Las principales características de estas cuatro cepas mutantes aparecen en el Cuadro 6. Cabe mencionar que la determinación de los tipos de apareamiento de las cepas anteriormente enlistadas, y en particular para la cepa *udi1*(Met<sup>-</sup> *a2b1*), resultó un tanto difícil en vista de la tendencia de dichas cepas de crecer desarrollando micelio aéreo (colonias peludas/aterciopeladas) por sí solas, es decir sin aparearlas con ninguna otra cepa. Se determinó que la fuente de este fenotipo fue la cepa FB1 (*a1b1*), cuyas esporidias eran inusualmente alargadas al ser cultivadas en medio líquido, y cuyas colonias en medio sólido desarrollaban micelio aéreo por sí solas. En base a esto se decidió evitar el uso de la cepa FB1 hasta donde fuera posible a fin de eliminar las inconveniencias mencionadas, y usar en su lugar la cepa 002 (*a1b1*), cuyo crecimiento es similar al de la cepa FB2 (*a2b2*); estas dos cepas crecen en medio líquido como esporidias de longitud normal y no

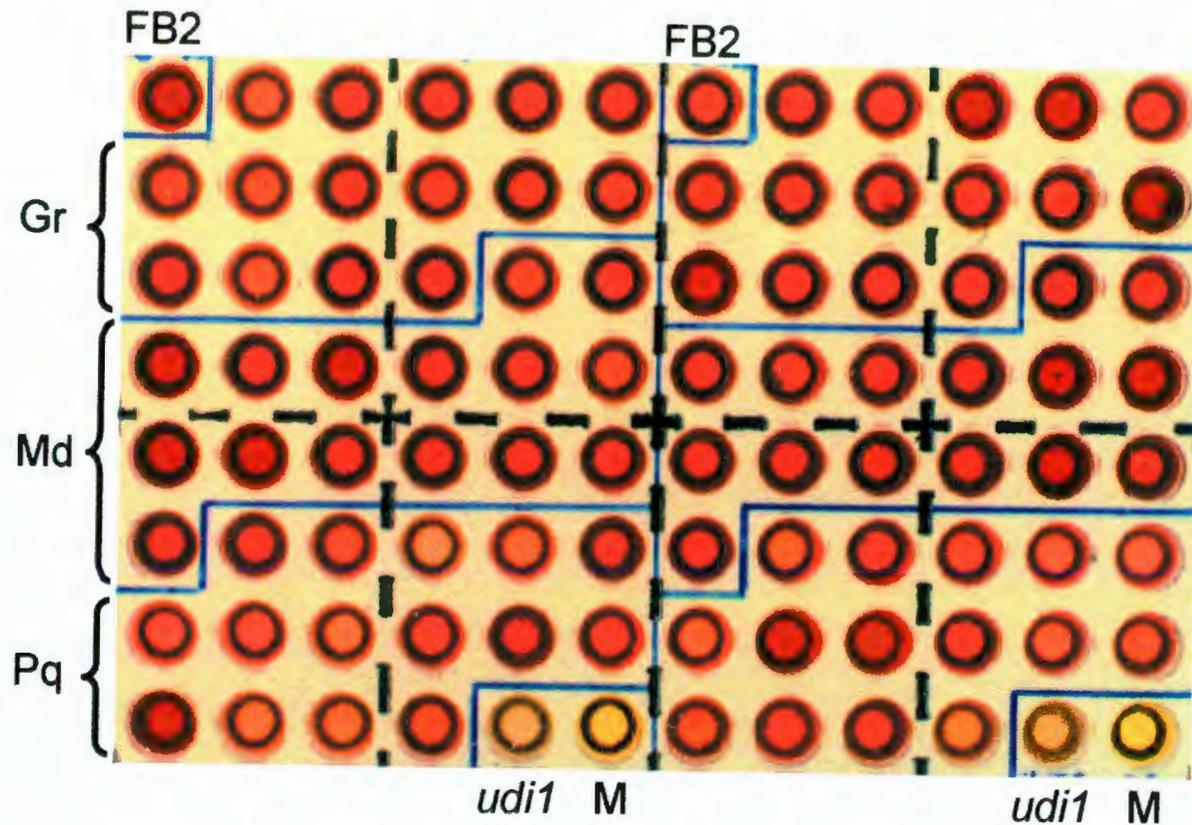


Figura 19. Selección con el método de Salkowski de cepas mutantes AIA<sup>-</sup> progenie de la cruce de las cepas FB1 (AIA<sup>+</sup>) x *udi1* (AIA<sup>-</sup>) de *Ustilago maydis*. Se analizaron las colonias esporidiales que presentaron diámetros grandes (Gr), medianos (Md) y pequeños (Pq) al ser cultivadas en medio mínimo de Czapek-Dox sólido. Se incluyó la cepa FB2 (AIA<sup>+</sup>) como control positivo, así como la cepa mutante *udi1* (AIA<sup>-</sup>) y el medio de cultivo sin inocular (M: caldo papa-dextrosa con 0.1% p/v de L-triptofano) como controles negativos.

desarrollan micelio aéreo por sí solas en las pruebas de apareamiento *in vitro*.

Por otro lado, se seleccionaron tres aislados de colonias medianas y tres de colonias grandes que parecían presentar reacciones de Salkowski más débiles que las demás de su mismo tamaño. Los diez aislados seleccionados fueron analizados como se describe a continuación.

## **6.1.8. Análisis de cepas progenie AIA<sup>-</sup> compatibles**

### **6.1.8.1. Curvas de crecimiento y de producción *in vitro* de AIA**

La Figura 20 muestra el comportamiento de crecimiento y producción *in vitro* de AIA por las cuatro cepas de colonias pequeñas. Resultó obvio que estas cepas pudieron crecer sin problema en PDB con triptofano, de manera similar a como lo hicieron las cepas progenitoras. Sin embargo, la producción de AIA de las cepas mutantes fue mucho menor que la de la silvestre FB2, aunque cabe resaltar que no fue nula como la de la mutante original *udi1*. En base a estos resultados se decidió analizar, en experimentos posteriores, la capacidad infectiva de la cruce *udi1*(Met<sup>-</sup> *a1b1*) x *udi1*(Met<sup>-</sup> *a2b2*) en plántulas de maíz, comparándola con la cruce FB1 x FB2 (las cuales son cepas con tipos de apareamiento *a1b1* y *a2b2*, respectivamente).

Por otro lado, los tres aislados de colonia mediana y los tres de colonias grandes también crecieron vigorosamente en PDB con triptofano, aunque sus producciones máximas de AIA representaron entre el 70 y 95% de los niveles máximos producidos por la silvestre FB2 (datos no mostrados). Aunque las disminuciones respecto a la silvestre fueron en su mayoría estadísticamente significativas, no se consideraron lo suficientemente drásticas como para poder observar su efecto en las pruebas de infectividad en plántulas de maíz. Algunos de los niveles máximos de AIA de tales aislados fueron similares a los observados para las cepas silvestres 001 y 002; por lo tanto los aislados fueron considerados como AIA<sup>+</sup> y descartados de análisis posteriores. Asimismo, se consideró la posibilidad de llevar a cabo la búsqueda de mutantes *udi1* prototróficas, buscándolas mediante una selección con el método de Salkowski de un número grande de aislados de colonias grandes.

### **6.1.8.2. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz**

El Cuadro 8 presenta las calificaciones asignadas a los síntomas de infección producidos en plántulas de maíz por las cruces de las cepas AIA<sup>-</sup> compatibles obtenidas [*udi1*(Met<sup>-</sup> *a1b1*) x *udi1*(Met<sup>-</sup> *a2b2*)]. Las medias de ambos

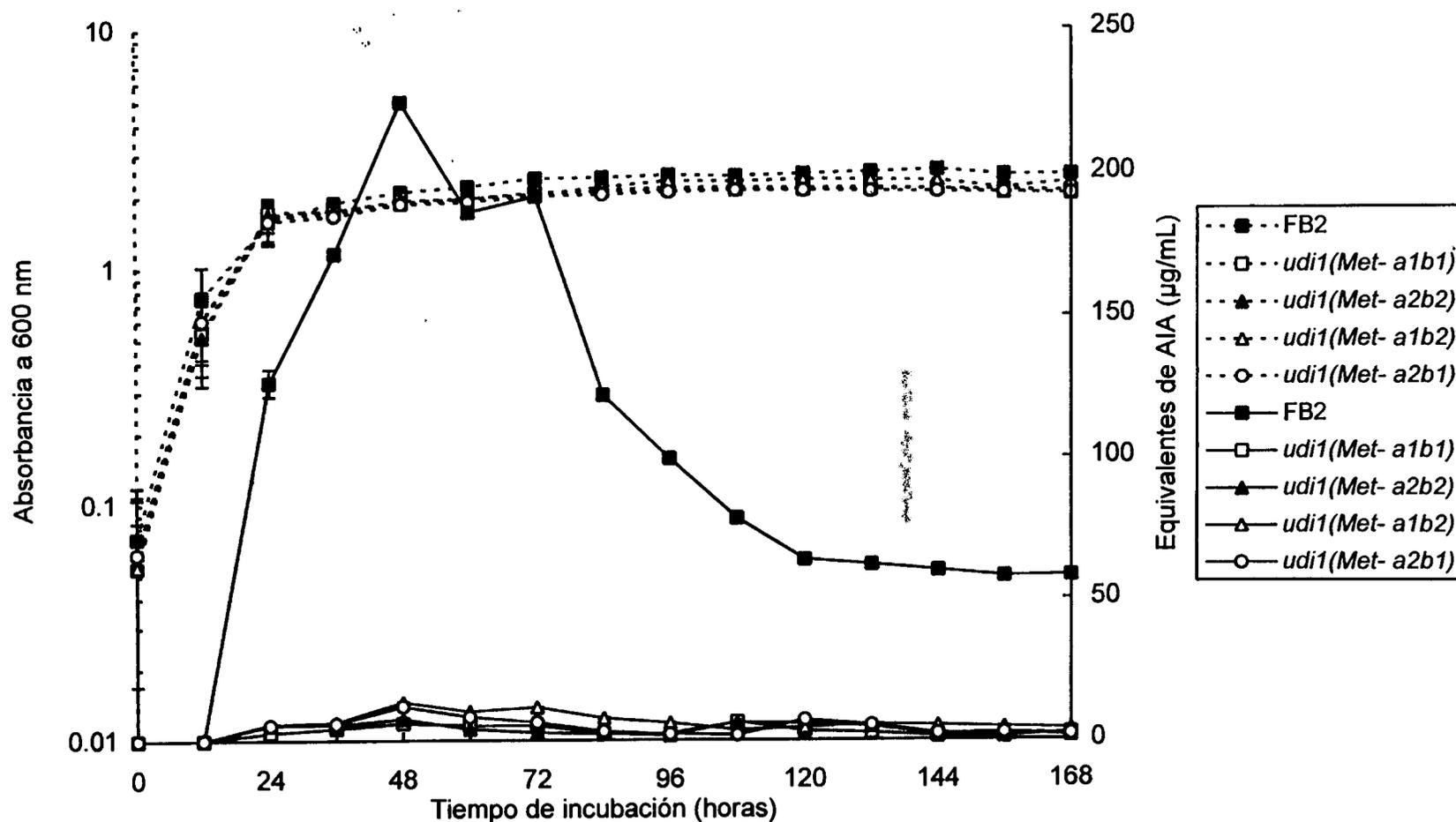


Figura 20. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepa silvestre FB2, y de cuatro cepas mutantes AIA<sup>-</sup> progenie de la cruce de las cepas FB1 (AIA<sup>+</sup>) x *udi1* (AIA<sup>-</sup>) de *Ustilago maydis*. Los cultivos se hicieron en caldo papa-dextrosa suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA se cuantificaron mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Cuadro 8. Calificaciones de síntomas de infección producidos por cruzas de cepas silvestres [AIA<sup>+</sup>] y mutantes *udi*(Met<sup>-</sup>) [AIA<sup>-</sup>] de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz.

Cruza [Fenotipo AIA]	Número de plantas que presentaron los síntomas <sup>1</sup> (% del total de plantas inoculadas)						Número total de plantas inoculadas	Media <sup>2</sup>
	0	1	2	3	4	5		
FB1 x FB2 [AIA <sup>+</sup> ]	8 (2.9)	88 (32.1)	64 (23.4)	14 (5.1)	89 (32.5)	11 (4.0)	274 (100.0)	2.4 a
<i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> a1b1) x <i>udi1</i> (Met <sup>-</sup> a2b2) [AIA <sup>-</sup> ]	26 (9.2)	149 (52.8)	37 (13.1)	19 (6.7)	51 (18.1)	0 (0)	282 (99.9)	1.7 b

<sup>1</sup> Síntomas: 0) no hay síntomas de infección, 1) producción de antocianinas (pigmento rojo), 2) agallas pequeñas y/o escasas en hojas y/o tallo, 3) agallas medianas y/o medianamente abundantes en hojas y/o tallo, 4) agallas grandes y/o muy abundantes en hojas y/o tallo, 5) planta muerta con síntomas severos de infección.

<sup>2</sup> Medias con letra diferente son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

tratamientos (cruzas) fueron significativamente diferentes, habiéndose obtenido una calificación más baja para la crusa mutante, en comparación con la silvestre. En la crusa mutante, básicamente se observó un desplazamiento del número de plantas con síntomas severos de infección hacia los síntomas más leves.

A pesar de estos resultados, en este punto no fue posible asignar el efecto de reducción en la capacidad infectiva a un solo factor (mutación *udi1*), en vista de que las cepas mutantes, si bien pudieron crecer en medio mínimo de Czapek, lo hicieron pobremente en la placa de la que fueron aisladas inicialmente, y en pruebas de auxotrofia/prototrofia posteriores (datos no mostrados). En base a esto, estos aislados fueron considerados prácticamente como Met<sup>-</sup>. De esta manera, no puede concluirse que la menor infectividad de las cepas *udi1*(Met<sup>-</sup>) se debe a que producen menos AIA que las silvestres, ya que alternativamente podría deberse a que las cepas son Met<sup>-</sup>, lo cual las podría hacer menos infectivas. A este respecto, se ha reportado que las cruzas de cepas auxotróficas compatibles en su tipo de apareamiento no son patogénicas (Barrett y col., 1993; Holliday, 1961). Sin embargo, la crusa *udi1*(Met<sup>-</sup> *a1b1*) x *udi1*(Met<sup>-</sup> *a2b2*) en el presente estudio resultó en síntomas relativamente severos de infección; posiblemente tenga algo que ver que dichas cepas presenten una auxotrofia Met<sup>-</sup> solo parcial ("leaky").

Al analizar esta información, se consideró la posibilidad de que las cepas auxotróficas resulten poco o nada infectivas debido a que han perdido por lo menos parte de su capacidad de sobrevivir en las condiciones en que generalmente son inoculadas a la plántula de maíz, es decir, suspendidas en agua en ausencia de nutrientes. De esa manera, se consideró la hipótesis de que las cepas auxotróficas dan baja o nula infectividad debido a que mueren más rápidamente en suspensión en agua en relación a las cepas prototróficas, y solamente un relativamente bajo número de células logra aparearse y penetrar la planta para infectarla.

Como un primer intento de poner a prueba esta hipótesis, se planteó analizar la capacidad de sobrevivencia de las cepas involucradas en las cruzas descritas (Cuadro 8) al estar suspendidas en agua alrededor del periodo de tiempo en que son inoculadas a las plántulas de maíz en las pruebas de infectividad.

### **6.1.8.3. Capacidad de sobrevivencia en agua**

Como se puede apreciar en la Figura 21, la capacidad de sobrevivencia durante la suspensión en agua, fue mayor para las cepas silvestres que para las cepas mutantes. Esto se desprende de la menor pendiente que muestran las

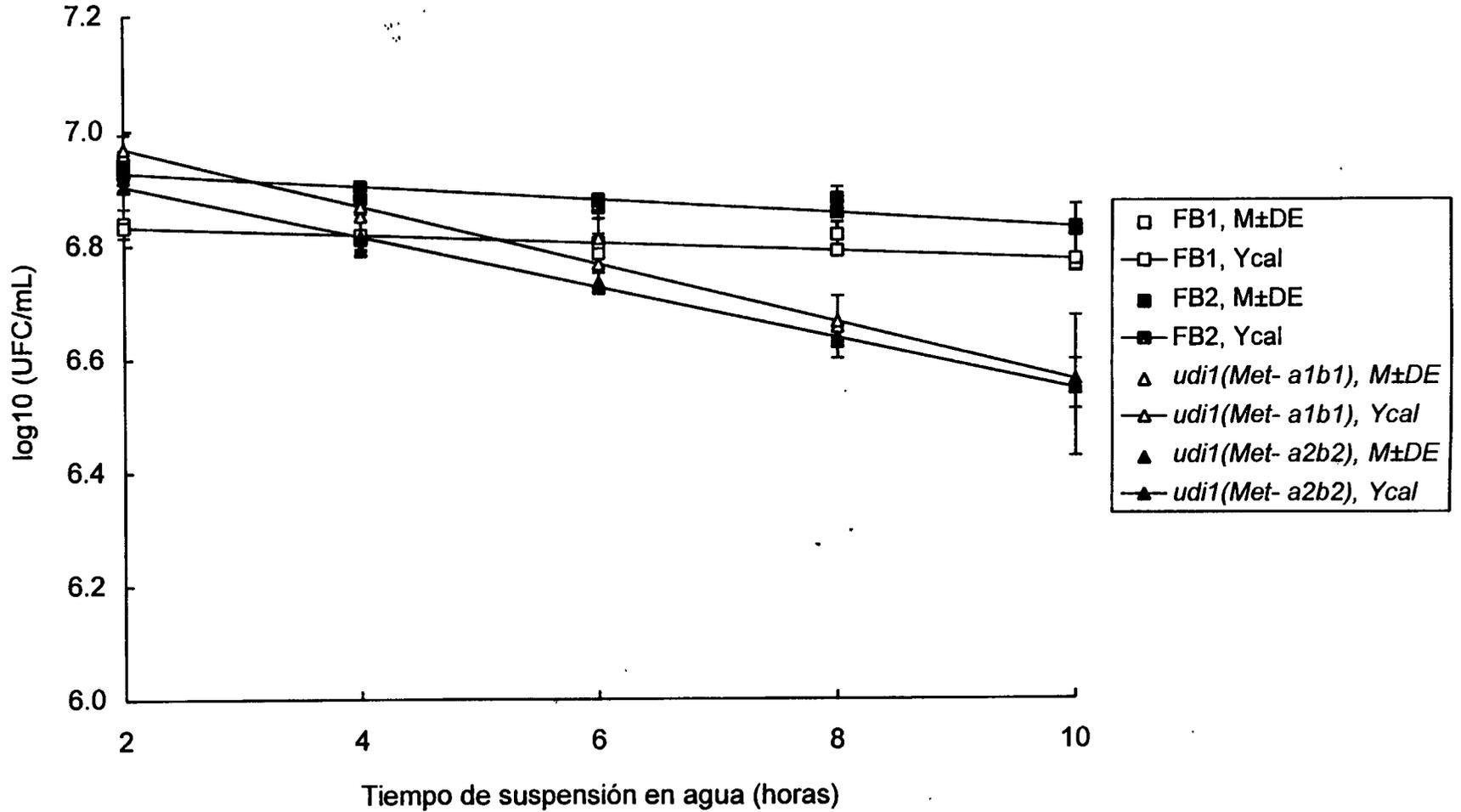


Figura 21. Capacidad de sobrevivencia en agua a 25 °C de las cepas silvestres FB1 y FB2, y de dos cepas mutantes AIA<sup>-</sup> progenie de la cruce de las cepas FB1 (AIA<sup>+</sup>) x *udi1* (AIA<sup>-</sup>) de *Ustilago maydis*. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se cultivaron en agar papa-dextrosa durante 48 h a 30 °C. Se muestran medias (M) de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar (DE) así como la línea de regresión de mínimos cuadrados (Ycal) que mejor ajusta los datos experimentales, para cada cepa.

rectas de inactivación (muerte) celular de las cepas silvestres. En otras palabras, estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que las cepas mutantes *udi1*(Met<sup>-</sup>) pueden ser menos infectivas debido a que se mueren más rápido que las silvestres durante el tiempo que tardan en aparearse y penetrar a la planta de maíz y no porque producen menos AIA.

En este experimento, se observó la sobrevivencia de las células durante las primeras diez horas inmediatas a su suspensión en agua destilada estéril. Generalmente, en las pruebas de infectividad, todas las plántulas de un experimento (alrededor de 500) pueden ser inoculadas entre la hora tres y la hora siete, por lo cual el período de tiempo considerado en la Figura 21 comprende el comportamiento de muerte de las células antes, durante e inmediatamente después de su inoculación a las plántulas. Aún así, se consideró que, en experimentos posteriores, sería interesante observar la gráfica de sobrevivencia durante un tiempo mayor a fin de tener una mejor idea de dicho comportamiento en las diferentes cepas.

#### **6.1.9. Obtención y análisis de cepas progenie AIA<sup>-</sup> compatibles prototróficas**

Como ya se mencionó, en base a los experimentos anteriores se decidió llevar a cabo la búsqueda de aislados progenie de la mutante nula *udi1* que fueran AIA<sup>-</sup>, prototróficos (Met<sup>+</sup>) y de ser posible compatibles entre sí. Para esto se inoculó la cruce de las cepas *udi1* x 002 en plántulas de maíz. Similar a lo observado con la cruce *udi1* x FB1, se obtuvieron plantas infectadas que desarrollaron tumores y teliosporas.

##### **6.1.9.1. Selección**

Nuevamente, las teliosporas fueron germinadas en las condiciones adecuadas. Las colonias resultantes de la germinación de las teliosporas fueron reunidas en lotes de 40 a 100 colonias (cada una proveniente de una teliospora). En total se colectaron aproximadamente 1,540 de dichas colonias, las cuales representarían alrededor de 6,160 aislados esporidiales diferentes, considerando que la germinación de cada teliospora resulta en cuatro productos meióticos (esporidias o basidiosporas) distintos. La progenie esporidial fue lavada, diluida y sembrada en medio mínimo de Czapek-Dox sólido para obtener colonias aisladas. También se obtuvieron colonias grandes, medianas y pequeñas aproximadamente en las mismas proporciones observadas para la cruce *udi1* x FB1. De los aislados esporidiales obtenidos, se muestrearon 1,620 de colonia grande a los que se

sometió al proceso de selección con el reactivo de Salkowski. Después de dos rondas de selección, se obtuvieron 35 aislados que parecían presentar el fenotipo AIA<sup>-</sup>.

#### **6.1.9.2. Pruebas de apareamiento *in vitro***

Los 35 aislados obtenidos del proceso de selección fueron analizados para determinar su tipo de apareamiento *in vitro*, cruzándolos con las cepas silvestres de tipo conocido. En estas determinaciones la mayoría de los aislados presentó un tipo de apareamiento bien definido, aunque también se detectaron nueve que presentaron anomalías en su capacidad de apareamiento *in vitro*. En particular, tres mostraron un tipo *a1bx*, es decir una especificidad de apareamiento por los alelos *b1* y *b2*; otros tres tuvieron un tipo de apareamiento bien definido aunque sus colonias desarrollaron micelio aéreo débilmente por sí solas (sin ser apareadas); las restantes tres tuvieron un tipo de apareamiento bien definido aunque la reacción de apareamiento fue inusualmente débil.

De los 35 aislados se seleccionaron 21 para ser analizados en cuanto a sus curvas de crecimiento y producción de AIA en medio mínimo, como se describe a continuación.

#### **6.1.9.3. Curvas de crecimiento y de producción *in vitro* de AIA**

La determinación de estas curvas en medio mínimo de Czapek-Dox puso de manifiesto diferencias altamente significativas en cuanto a producción de AIA, mas no en cuanto a crecimiento, entre las dos cepas silvestres FB2 y 002 (Figura 22). La primera produjo menos del 50% del máximo nivel alcanzado por la 002. Además, la mayoría de los 21 aislados progenie seleccionados crecieron en dicho medio tan vigorosamente como las cepas silvestres incluidas en el experimento; en la Figura 22 se muestran los comportamientos de crecimiento y de producción de AIA de los siete aislados más interesantes. Cabe mencionar que en estos análisis se incluyeron las cepas *udi1*, *udi2* y *udi3*, observándose que ninguna de las tres pudo crecer en cultivo agitado en este medio, a pesar de que la *udi2* y la *udi3* sí pueden crecer, aunque débilmente, en el mismo medio sólido.

Por otro lado, 16 de los 21 aislados progenie mostraron niveles máximos de AIA que representaron más del 70% del nivel máximo producido por la cepa 002; en la Figura 22 aparecen dos de los 16 aislados [designados como *udi1(a1bx)175* y *udi1(a2b1)175*], los cuales mostraron alrededor del 175% del nivel máximo de AIA alcanzado por la cepa FB2. En el Cuadro 6 se describen las

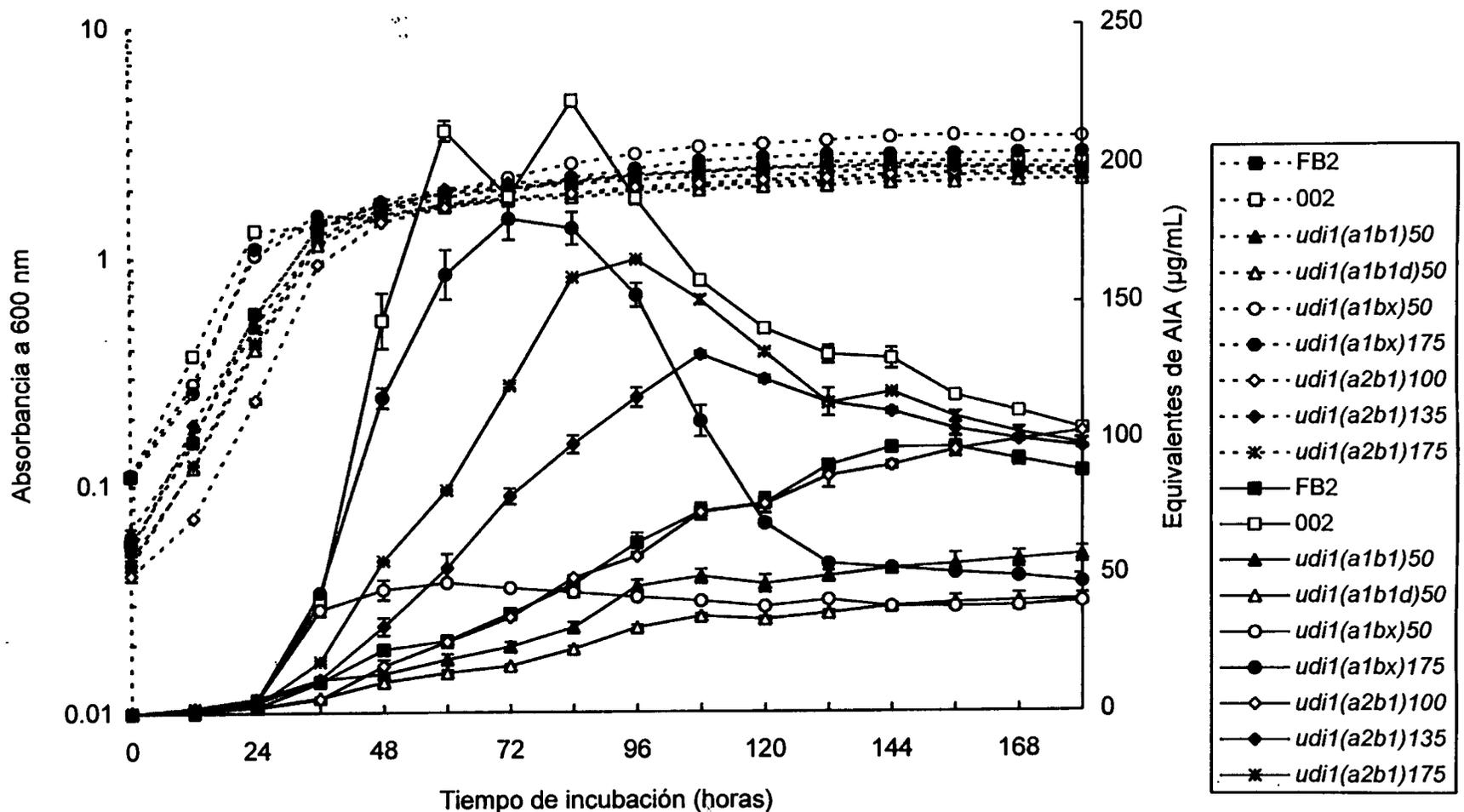


Figura 22. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepas silvestres FB2 y 002, y de siete cepas mutantes progenie de la cruce de las cepas 002 (AIA<sup>+</sup>) x *udi1* (AIA<sup>-</sup>) de *Ustilago maydis*, en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA se cuantificaron mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones ± desviación estándar.

principales características de los dos aislados mencionados y de los cinco aislados restantes. En vista de su relativamente alta producción de AIA, y de que el aislado *udi1(a1bx)175* presentó un tipo de apareamiento *a1bx*, estos dos aislados fueron excluidos de los análisis posteriores de capacidad infectiva en plantas de maíz. De los restantes cinco aislados, tres de ellos [*udi1(a1b1)50*, *udi1(a1b1d)50* y *udi1(a1bx)50*] mostraron niveles máximos de AIA que representaron alrededor del 50% de los niveles alcanzados por la cepa FB2; uno de ellos [*udi1(a2b1)100*] mostró aproximadamente el mismo nivel máximo alcanzado por la cepa FB2; mientras que el aislado restante [*udi1(a2b1)135*] presentó niveles intermedios entre los máximos de las cepas FB2 y 002. Desafortunadamente, el aislado *udi1(a1bx)50* también presentó un tipo de apareamiento anómalo (*a1bx*), mientras que el aislado *udi1(a1b1d)50* dio una reacción de apareamiento débil con la cepa control ("tester") compatible.

En vista de lo anterior, se decidió analizar la capacidad infectiva de las cepas *udi1(a1b1)50*, *udi1(a2b1)100*, y *udi1(a2b1)135* en cruzas con cepas silvestres y con la mutante *udi1*, a objeto de determinar el efecto de la producción de AIA por dichas cepas sobre la capacidad de inducir infección y tumores en plántulas de maíz. Cabe mencionar que estas tres cepas mostraron tipos de apareamiento bien definidos, dando reacciones de apareamiento de alta intensidad con las cepas control ("testers"), lo cual indicó que no presentan alteraciones aparentes en su capacidad de apareamiento *in vitro*. Además las tres cepas seleccionadas crecieron vigorosamente en los cultivos agitados en medio mínimo de Czapek-Dox con triptofano, lo cual indicó que son cepas prototróficas (Met<sup>+</sup>). Tomando en cuenta que de 1,620 aislados esporidiales analizados, los cuales fueron representativos de 6,160 productos meióticos colectados, se obtuvo solo una cepa [*udi1(a1b1)50*] con producción de AIA menor (50%) que la cepa FB2, y que además fue prototrófica y no presentó anomalías en su capacidad de apareamiento *in vitro*, la probabilidad calculada de encontrar dicha mutante fue de 1/6160, o sea alrededor de  $1.6 \times 10^{-4}$ .

#### **6.1.9.4. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz**

El Cuadro 9 muestra los resultados de las pruebas de infectividad de las cruzas que involucraron a las cepas mutantes obtenidas, así como algunas de las cepas silvestres utilizadas durante el estudio. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las cruzas probadas. Dos de las tres cruzas más infectivas fueron la 001 x 002, y la 031 x 032, lo cual concuerda

Cuadro 9. Calificaciones de síntomas de infección producidos por cruzas de cepas silvestres y mutantes de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz.

Cruza	Número de plantas que presentaron los síntomas <sup>1</sup> (% del total de plantas inoculadas)						Número total de plantas inoculadas	Media <sup>2</sup>
	0	1	2	3	4	5		
001 x 002	18 (3.5)	135 (26.1)	169 (32.7)	87 (16.8)	76 (14.7)	32 (6.2)	517 (100)	2.28 a
031 x 032	48 (9.3)	101 (19.5)	211 (40.7)	67 (12.9)	65 (12.5)	26 (5.0)	518 (100)	2.11 ab
002 x FB2	37 (6.9)	212 (39.5)	219 (40.8)	41 (7.6)	16 (3.0)	12 (2.2)	537 (100)	1.77 c
<i>udi1(a2b1)100</i> x 031	20 (3.9)	113 (21.9)	210 (40.7)	75 (14.5)	70 (13.6)	28 (5.4)	516 (100)	2.24 a
<i>udi1(a1b1)50</i> x 001	14 (2.8)	180 (36.3)	186 (37.5)	51 (10.3)	42 (8.5)	23 (4.6)	496 (100)	1.99 bc
<i>udi1(a2b1)135</i> x 031	42 (8.1)	146 (28.1)	218 (42.0)	47 (9.1)	42 (8.1)	24 (4.6)	519 (100)	1.89 bc
<i>udi1(a1b1)50</i> x FB2	19 (3.4)	186 (33.6)	250 (45.1)	42 (7.6)	31 (5.6)	26 (4.7)	554 (100)	2.01 bc
002 x <i>udi1</i>	36 (6.8)	203 (38.2)	209 (39.3)	45 (8.5)	22 (4.1)	17 (3.2)	532 (100)	1.83 c
<i>udi1(a1b1)50</i> x <i>udi1</i>	146 (28.1)	243 (46.8)	97 (18.7)	18 (3.5)	14 (2.7)	1 (0.2)	519 (100)	1.01 d

<sup>1</sup> Síntomas: 0) no hay síntomas de infección, 1) producción de antocianinas (pigmento rojo), 2) agallas pequeñas y/o escasas en hojas y/o tallo, 3) agallas medianas y/o medianamente abundantes en hojas y/o tallo, 4) agallas grandes y/o muy abundantes en hojas y/o tallo, 5) planta muerta con síntomas severos de infección.

<sup>2</sup> Medias con letra diferente son significativamente diferentes según la prueba de Student-Newman-Keuls ( $\alpha = 0.05$ ).

con una elevada producción de AIA por estas cepas. Sin embargo, resultó inesperado el hecho de que la cruce *udi1(a2b1)100* x 031 fuera incluso más infectiva que la cruce 002 x FB2, en vista de que *udi1(a2b1)100* y FB2 producen aproximadamente los mismos niveles máximos de AIA, al igual que la cepas 002 y la 031. Adicionalmente, la cruce 002 x FB2 mostró un nivel similar de infectividad al de la cruce 002 x *udi1*, lo cual fue inesperado ya que esta última cruce involucra la mutante *udi1*, la cual es AIA<sup>-</sup> y Met<sup>r</sup>. Se desconoce la razón por la cual la cepa FB2 dio niveles tan bajos de infección al ser cruzada con la 002, ya que además FB2 produce niveles de AIA similares a los que produce la cepa 001, la cual dio una mayor infectividad al ser cruzada con la 002.

Por otro lado, las cruces de la cepa *udi1(a1b1)50* con 001 y FB2 resultaron en niveles de infección significativamente menores que los mostrados por las cruces consideradas como control (001 x 002 y 031 x 032). La diferencia en infectividad entre las cruces *udi1(a1b1)50* x 001 y 001 x 002 puede ser atribuida al fenotipo AIA<sup>-</sup> de la cepa *udi1(a1b1)50*. Sin embargo en vista de que la cepa FB2 dio baja infectividad al cruzarla con la 002, la menor infectividad de la cruce *udi1(a1b1)50* x FB2 podría deberse a la cepa FB2 y no al carácter AIA<sup>-</sup> de la cepa *udi1(a1b1)50*.

Por otra parte, la cruce *udi1(a2b1)135* x 031 dio una calificación que no fue significativamente diferente de la de las cruces *udi1(a1b1)50* x 001 y *udi1(a1b1)50* x FB2, aunque fue inesperadamente baja en vista de que la cepa *udi1(a2b1)135* produce más AIA que las cepas 001 y FB2. En este caso tampoco parece haber una relación directa entre la capacidad de las cepas de producir AIA *in vitro* y su capacidad de inducir infección en planta. Sin embargo, al comparar las infectividades de las cruces 002 x *udi1* y *udi1(a1b1)50* x *udi1*, la diferencia es estadísticamente significativa y mucho mayor que todas las otras diferencias entre las medias. En vista de que ambas cruces involucran a la mutante AIA<sup>-</sup> nula *udi1* original, de que las cepas 002 y *udi1(a1b1)50* son prototróficas y no tienen problemas para aparearse *in vitro*, y de que poseen muy diferentes capacidades de producir AIA *in vitro*, la diferencia en la capacidad infectiva de estas dos cruces es atribuible a la diferencia en su capacidad de producir AIA *in vitro*.

Cabe mencionar que en este experimento, el cual tuvo un diseño factorial de bloques incompletos al azar, las plántulas fueron calificadas por tres evaluadores diferentes sin tener conocimiento de la identidad de las cruces inoculadas en las plantas que calificaron. Si bien uno de los evaluadores fue significativamente diferente de los otros dos, la interacción cruce x evaluador no

fue estadísticamente significativa, lo cual indicó que hubo consistencia entre los evaluadores en la calificación de las diferentes cruzas.

También, los resultados sugieren que el o los genes afectados en las mutantes *udi1* y *udi1(a1b1)50* tienen que ver con la patogenicidad del hongo, lo cual hace de este reporte el primero a ese respecto. En un estudio reciente en el que se generaron mutantes de *U. maydis* con menor capacidad de convertir IAAd en AIA, Basse y col. (1996) concluyeron que el gen aislado (IAAd deshidrogenasa) no juega un papel crucial en el apareamiento, en la formación del micelio dicariótico ni en la patogenicidad.

Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de que las cepas de *Ustilago maydis* requieren de la capacidad de producir AIA para poder ser infectivas e inducir tumores en el huésped. En las cruzas analizadas, las cepas que produjeron altos valores de infectividad fueron las que por lo general también mostraron alta producción de AIA *in vitro*. Por el contrario, la craza *udi1(a1b1)50* x *udi1* mostró los niveles más bajos de infectividad y estas cepas fueron las que produjeron menores niveles de AIA *in vitro*. Sin embargo, cabe también mencionar que los resultados sugieren la participación de otros factores, además de la capacidad de apareamiento *in vitro* y de producción de AIA, que influyen sobre la infectividad. Dichos factores parecen ser dominantes sobre la capacidad de producción de AIA, enmascarando el papel de este sobre la inducción de infección y tumores. Esto fue particularmente obvio en las cruzas que involucraron a la cepa FB2 y a las cruzas de cepas mutantes x silvestres. De hecho se ha reportado un cierto número de genes no ligados a los loci de apareamiento, los cuales son comúnmente considerados los principales loci de patogenicidad de *U. maydis* (Banuett, 1992). Trabajos posteriores deberán abocarse a estudiar la interacción que dichos determinantes pudieran tener con la capacidad de producción de AIA.

Por otro lado, los resultados del presente trabajo también sugieren la idea de que la capacidad del hongo de producir AIA (sin intervención de la capacidad de la planta) podría ser la responsable de la formación de los tumores. Una de las perspectivas sería obtener un número adicional de mutantes *udi1* que sean prototróficas, compatibles y que muestren producción de AIA aún menor (de ser posible nula) que las cepas obtenidas hasta ahora. Estas cepas podrían obtenerse retrocruzando las mutantes obtenidas [principalmente la *udi1(a1b1)50*] con la mutante *udi1* original, y seleccionando las mutantes requeridas como se hizo en el presente trabajo. Asimismo, será necesario llevar a cabo una limpieza adicional del fondo genético de las mutantes obtenidas hasta ahora, mediante retrocruzas con

cepas silvestres compatibles, tales como las cepas 001, 002, 031 y 032.

Finalmente, resulta muy sugestiva la observación de que la mutante *udi1* sea AIA<sup>-</sup> y Met<sup>-</sup>, y de que algunas de las mutantes progenie obtenidas (también AIA<sup>-</sup> pero Met<sup>+</sup>) hayan presentado tipos de apareamiento *a1bx*. Es decir, estas mutantes parecen estar dañadas en su locus *b*, por lo cual parecen haber adquirido la capacidad de aparearse tanto con cepas que llevan el alelo *b1* como con aquéllas que tienen el *b2*. Las regiones que determinan la especificidad por *b1* o *b2* ya han sido caracterizadas (Yee y Kronstad, 1993) y se ha visto que es posible generar mutantes alteradas en dicha especificidad manipulando tales regiones. Por otro lado, Holliday (1974) reportó el único mapa de ligamiento que se ha publicado para *U. maydis* (Figura 23). En él, se muestra una auxotrofia para metionina (*me1*) ligada en el mismo "cromosoma" (grupo de ligamiento) al locus *b*, encontrándose el centrómero entre estos dos marcadores. Además hay una auxotrofia para adenina (*ad1*) localizada relativamente cerca del marcador *me1* en dirección al otro extremo del mismo cromosoma. Como se recordará, las mutantes *udi2* y *udi3* resultaron ligeramente promovidas en su crecimiento por la adición de adenina al medio mínimo. Además, Kinscherf y Leong (1988) reportaron el cariotipo electroforético de *U. maydis*, en el que localizan al locus *b* en el cromosoma XVIII (uno de los de mayor tamaño molecular). En base a los resultados y observaciones del presente trabajo, se sugiere que la mutación AIA<sup>-</sup> de la cepa *udi1* podría estar localizada alrededor de la región entre el marcador *me1* y el locus *b* en el mapa de ligamiento de Holliday (1974) y tal vez en el cromosoma XVIII del cariotipo electroforético de Kinscherf y Leong (1988).

#### **6.1.9.5. Capacidad de sobrevivencia en agua**

La Figura 24 presenta la capacidad de sobrevivencia en agua de las principales cepas silvestres utilizadas en el estudio. Puede observarse que en general todas muestran buena viabilidad durante un período bastante largo de tiempo (48 h). Por otro lado, en la Figura 24 se observa como la mutante *udi1* muere más rápidamente que las cepas silvestres y que las otras dos mutantes (*udi2* y *udi3*) obtenidas en el estudio. Finalmente la Figura 24 muestra que dos de las cepas mutantes progenie [*udi1(a2b1)100* y *udi1(a2b1)135*] parecen "recuperarse" en cuanto a su viabilidad después de haber muerto durante las primeras 12 h de suspensión en agua. La mutante progenie *udi1(a1b1)50* mostró una capacidad de sobrevivencia en agua similar a la de las silvestres FB2 y 002, lo cual confirma que los resultados de infectividad discutidos anteriormente en los

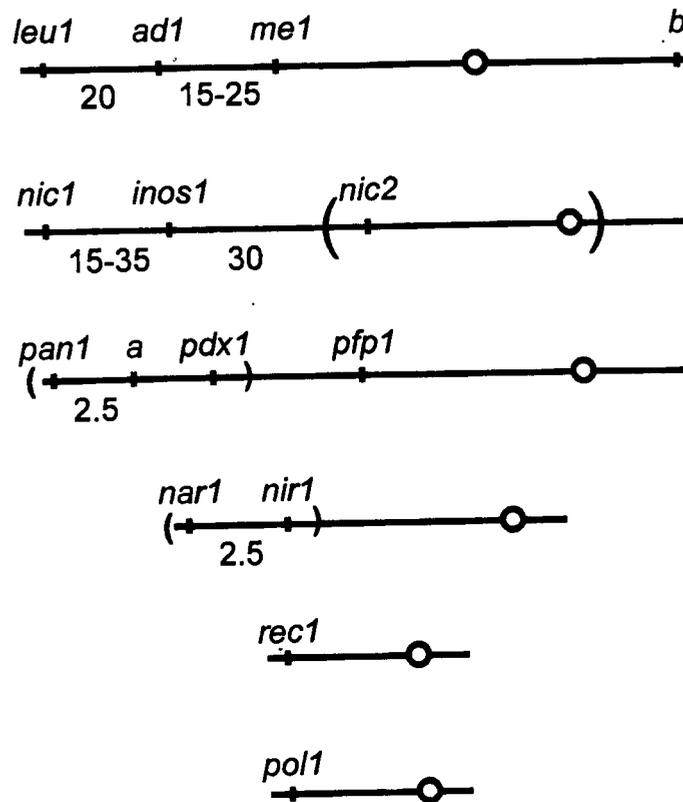


Figura 23. Mapa de ligamiento de *Ustilago maydis*. Los paréntesis indican que el orden de los marcadores en relación al centrómero es desconocido. Tomada de Holliday (1974).

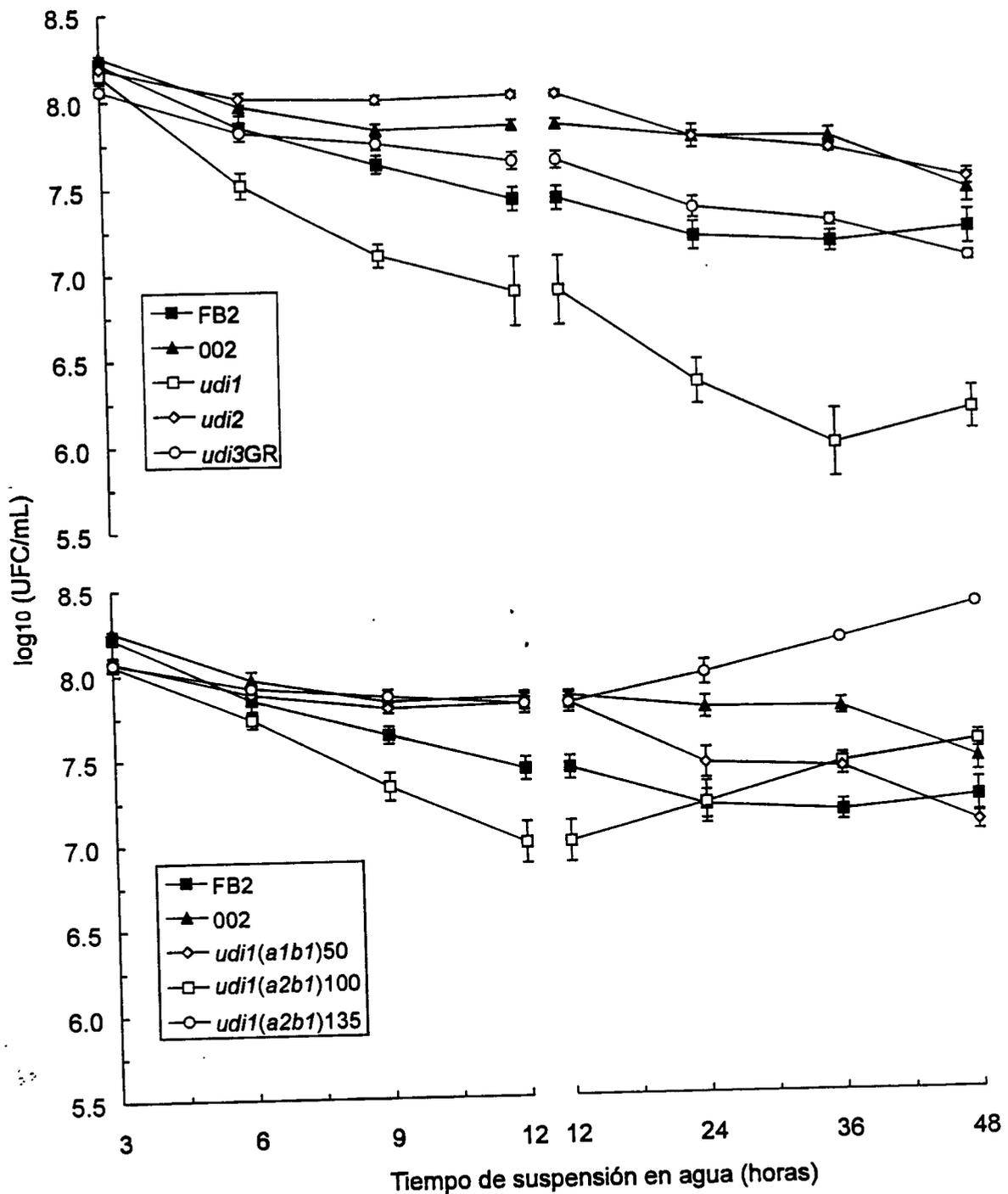


Figura 24. Capacidad de sobrevivencia en agua a 25 °C de dos cepas silvestres (FB2 y 002) y de seis cepas mutantes de *Ustilago maydis*. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se cultivaron en agar papa-dextrosa durante 48 h a 30 °C. Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

que participa dicha mutante, pueden ser atribuidos a su baja producción de AIA y no a su baja capacidad de sobrevivencia. Se desconoce el mecanismo por el cual las cepas parecen recuperarse (aumentar en número) aún estando suspendidas en agua en ausencia de nutrientes durante 48 h. Una posible explicación es que las células que están muriendo se estén lisando y aportando nutrientes a las células vivas; sin embargo las células fueron diluidas en agua a una densidad de aproximadamente 2,000 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL y mantenidas así durante la incubación; dicha densidad se considera baja para que esto estuviera sucediendo, además de que no ocurre en todas las cepas. Otra posibilidad es que las células que están gemando pero no han completado la citocinesis, la completan durante la suspensión en agua, aumentando así el número de UFC; sin embargo, esto no ocurre en todas las cepas analizadas.

## **6.2. Análisis de cepas silvestres de *Ustilago maydis***

Durante esta fase del trabajo, se determinaron curvas de crecimiento y de producción de AIA para seleccionar cepas con el mejor crecimiento, alta capacidad de producción de AIA *in vitro* y clara capacidad de apareamiento *in vitro* y para después probar su infectividad en plántulas de maíz. Las cepas seleccionadas fueron posteriormente sometidas a transformación con vectores portadores del gen *iaaL*.

### **6.2.1. Curvas de crecimiento y de producción *in vitro* de AIA**

El medio empleado fue el medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% de L-triptofano a objeto de poner de manifiesto las diferencias en las capacidades de crecimiento y de producción de AIA por las cepas. En todas las curvas de crecimiento se incluyeron las cepas 001 y 002 con fines comparativos.

La Figura 25 muestra los resultados para las principales cepas silvestres incluidas en el estudio. En general, las cepas crecieron bien en el medio mínimo, aunque la FB1 y la 001 presentaron fases de adaptación un tanto más prolongadas. Las cepas que alcanzaron los mayores niveles de AIA fueron la 002, 031 y 032, mientras que las de menor producción (aproximadamente 50%) fueron las dos cepas con tipo de apareamiento *a2b2*: FB2 y 001. Se desconoce la relación entre estos dos factores, por lo cual, resultaría interesante explorar ese aspecto en trabajos posteriores. Por otro lado, la cepa FB1 presentó una producción intermedia de AIA con respecto a las demás cepas de la Figura 25. También cabe hacer notar que en todas las cepas, el AIA pudo ser detectado en el medio de

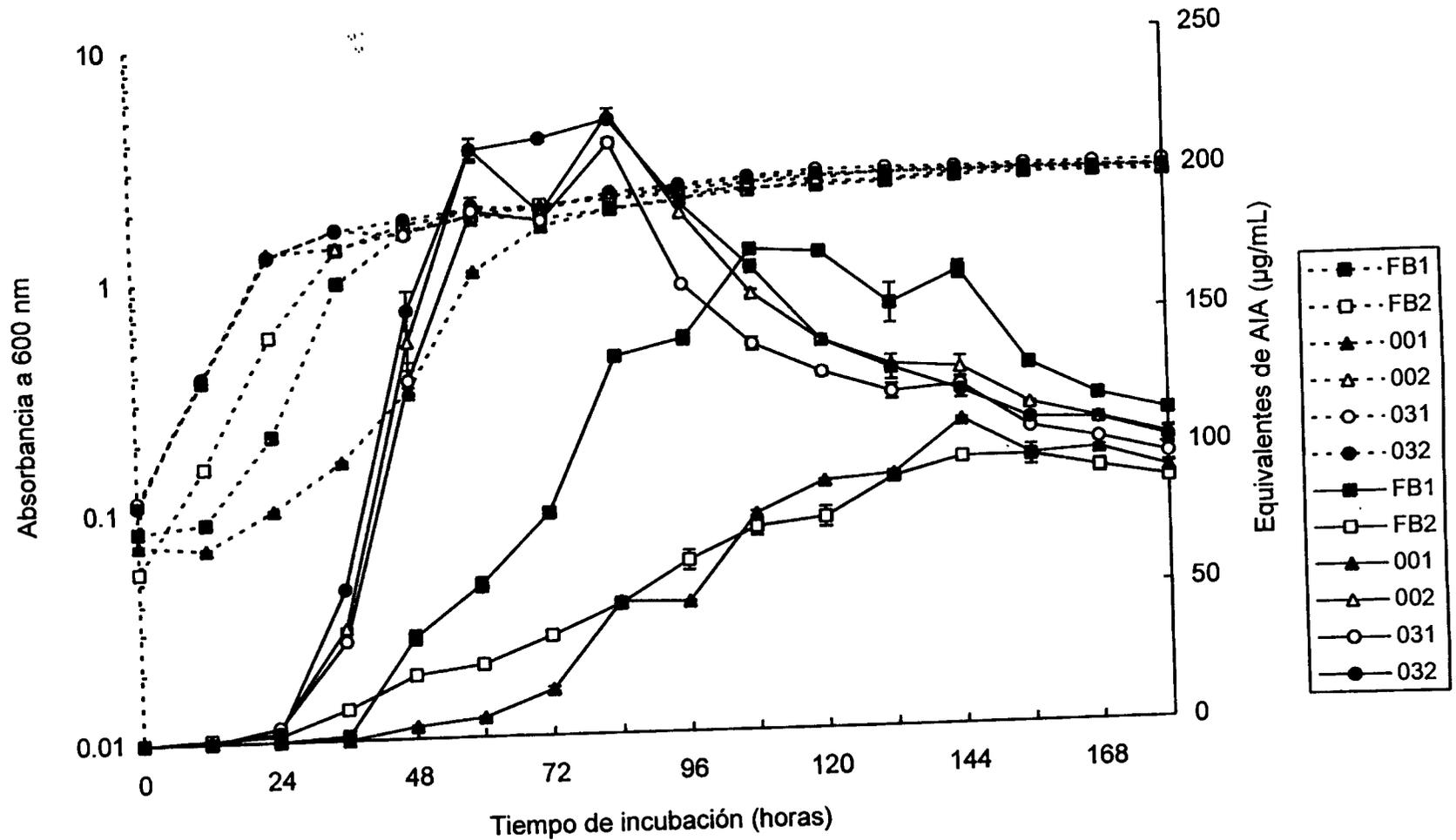


Figura 25. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de seis cepas silvestres de *Ustilago maydis*, en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA se cuantificaron mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

cultivo hacia el final de la fase de crecimiento exponencial y que la velocidad de acumulación fue visiblemente diferente entre las cepas, aún cuando sus velocidades de crecimiento fueron muy similares. Los máximos niveles de AIA fueron alcanzados durante la fase estacionaria en todas estas cepas. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Navarre y Damann (1990), con una producción vigorosa de AIA durante la fase exponencial, alcanzándose el máximo en la fase estacionaria de las cepas analizadas. Se ha reportado que la máxima producción de AIA se encuentra en la fase estacionaria debido a que la síntesis de proteínas disminuye durante esta fase, dejando disponible en mayor medida al L-triptofano para la biosíntesis de AIA (Surico y Iacobellis, 1992).

En la Figura 26 se observa el crecimiento de las cepas 001, 002, Bx711 y Bx722. Estas dos últimas son cepas consideradas casi isogénicas con la 002; ambas crecieron con el mismo vigor que la 002 en el medio mínimo, aunque su velocidad de acumulación y niveles máximos de AIA fueron intermedios entre 001 y 002 (sus progenitores).

También en la Figura 26 aparecen las curvas para las cepas solopatógenicas D12, d132 y P6D. El crecimiento de las cepas D12 y P6D fue muy similar al de la 001, con una fase de adaptación relativamente más larga que para la 002. En cambio, la cepa d132 creció con la misma velocidad que la 002, acumulando AIA a la misma velocidad que ésta durante las primeras 48 h de incubación, aunque solo produjo alrededor del 50% del nivel máximo alcanzado por la 002. Por otro lado, las cepas 001, D12 y P6D produjeron AIA aproximadamente a la misma velocidad durante las primeras 84 h de cultivo, tiempo en el cual la cepa P6D dejó de producirlo, alcanzando niveles máximos que representaron alrededor del 50% de los alcanzados por 001, D12 y d132. Estos resultados muestran diferencias significativas en cuanto a la velocidad de crecimiento, velocidad de acumulación y niveles máximos de AIA producido *in vitro* por las tres cepas solopatógenicas de laboratorio analizadas. Dichas observaciones no están de acuerdo con el reporte de Basse y Kahmann (1994), quienes no encontraron diferencias en producción de AIA en diversas cepas solopatógenicas (diploides).

En la Figura 27 aparecen las curvas de crecimiento y de producción de AIA de las cinco cepas aisladas de huitlacoche; dos de ellas, P1 y T4, fueron previamente reportadas por Valverde González (1992) como cepas solopatógenicas. Las cepas mostraron tiempos de adaptación al medio ligeramente diferentes, aunque todas crecieron relativamente bien en el medio mínimo. La cepa

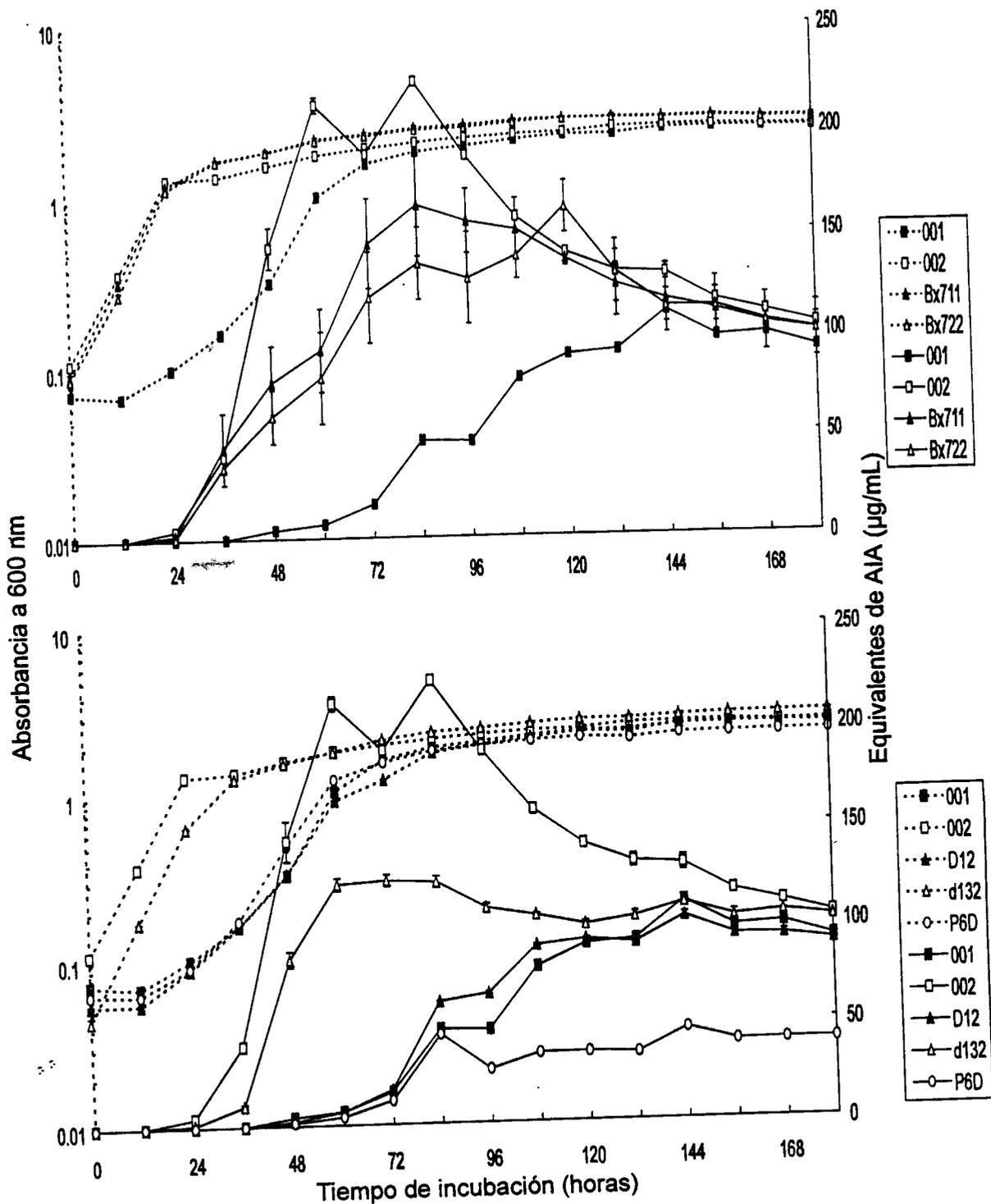


Figura 26. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de dos cepas silvestres (001 y 002), dos cepas casi isogénicas (Bx711 y Bx722) y tres cepas solopatogénicas (D12, d132 y P6D) de *Ustilago maydis*, en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptófano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA fueron cuantificados mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

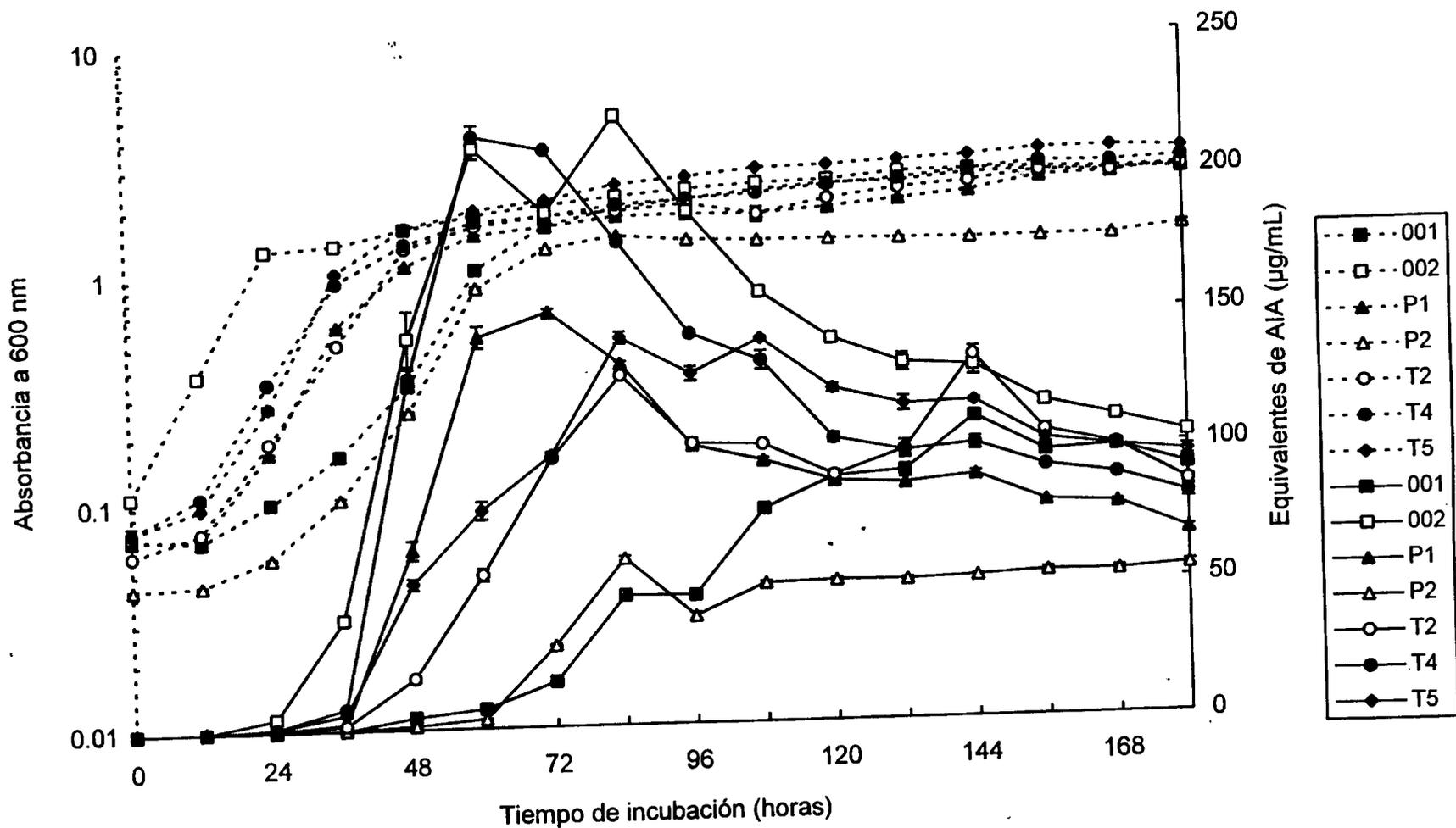


Figura 27. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de dos cepas silvestres de laboratorio (001 y 002) y cinco cepas aisladas de huitlacoche (P1, P2, T2, T4 y T5) de *Ustilago maydis*, en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con 0.1% (p/v) de L-triptofano. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA fueron cuantificados mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

P1, aunque creció y produjo AIA aproximadamente a la misma velocidad que la 002 durante las primeras 60 h de incubación, solo alcanzó alrededor del 70% del nivel máximo de AIA logrado por esta última cepa. En cambio, la cepa T4 fue la única de las aisladas de huitlacoche que creció y produjo AIA a las mismas velocidades que la 002, alcanzando niveles máximos de AIA similares a los de ésta. Similar a lo observado para las tres cepas solopatógenicas analizadas previamente (Figura 26), también hubo diferencias notorias entre las cepas solopatógenicas aisladas de huitlacoche. La cepa P2 creció de manera muy similar a la cepa 001, aunque produjo menos AIA que ésta, alcanzando solo el 50% de su nivel máximo. Las cepas restantes (T2 y T5), si bien crecieron a la misma velocidad que 002 y T4, produjeron AIA a una velocidad intermedia entre la 001 y la 002, alcanzando también niveles máximos intermedios entre los de estas cepas.

Como una forma de confirmar la presencia de AIA en los medios de cultivo de algunas de las cepas analizadas hasta este punto, los medios gastados fueron sometidos a extracción con acetato de etilo y analizados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y HPLC. La Figura 28 representa una muestra de los análisis realizados. Aunque se detectaron otros compuestos indólicos tanto por TLC como por HPLC, dichos compuestos no fueron identificados en este trabajo. Diversos estudios han reportado la presencia de principalmente AIA y AIPir en extractos de cultivos de *U. maydis* (Basse y col., 1996; Basse y Kahmann, 1994; Navarre, 1990).

De acuerdo a estos resultados, las cepas 001, 002, Bx711, Bx722, D12, d132, P6D, P1, P2, T2, T4 y T5 fueron consideradas para ser analizadas en cuanto a su capacidad de apareamiento *in vitro*.

### **6.2.2. Pruebas de apareamiento *in vitro***

Todas las cepas consideradas en la sección anterior para experimentos de infectividad, fueron analizadas primero para determinar su capacidad de apareamiento *in vitro*. Las cepas 001, 002, Bx711 y Bx722 mostraron claramente los tipos de apareamiento esperados (previamente determinados; Cuadro 2). Por su parte, las cepas solopatógenicas D12, d132 y P6D mostraron micelio aéreo por sí solas en las pruebas de apareamiento, como también era esperado. Sin embargo, las cepas solopatógenicas P1 y T4 no mostraron el micelio aéreo esperado, mientras que las cepas haploides P2, T2 y T5 presentaron reacciones de apareamiento inusualmente débiles, o con más de una cepa control ("tester"), o con ninguna cepa control (datos no mostrados). Como consecuencia, se analizaron

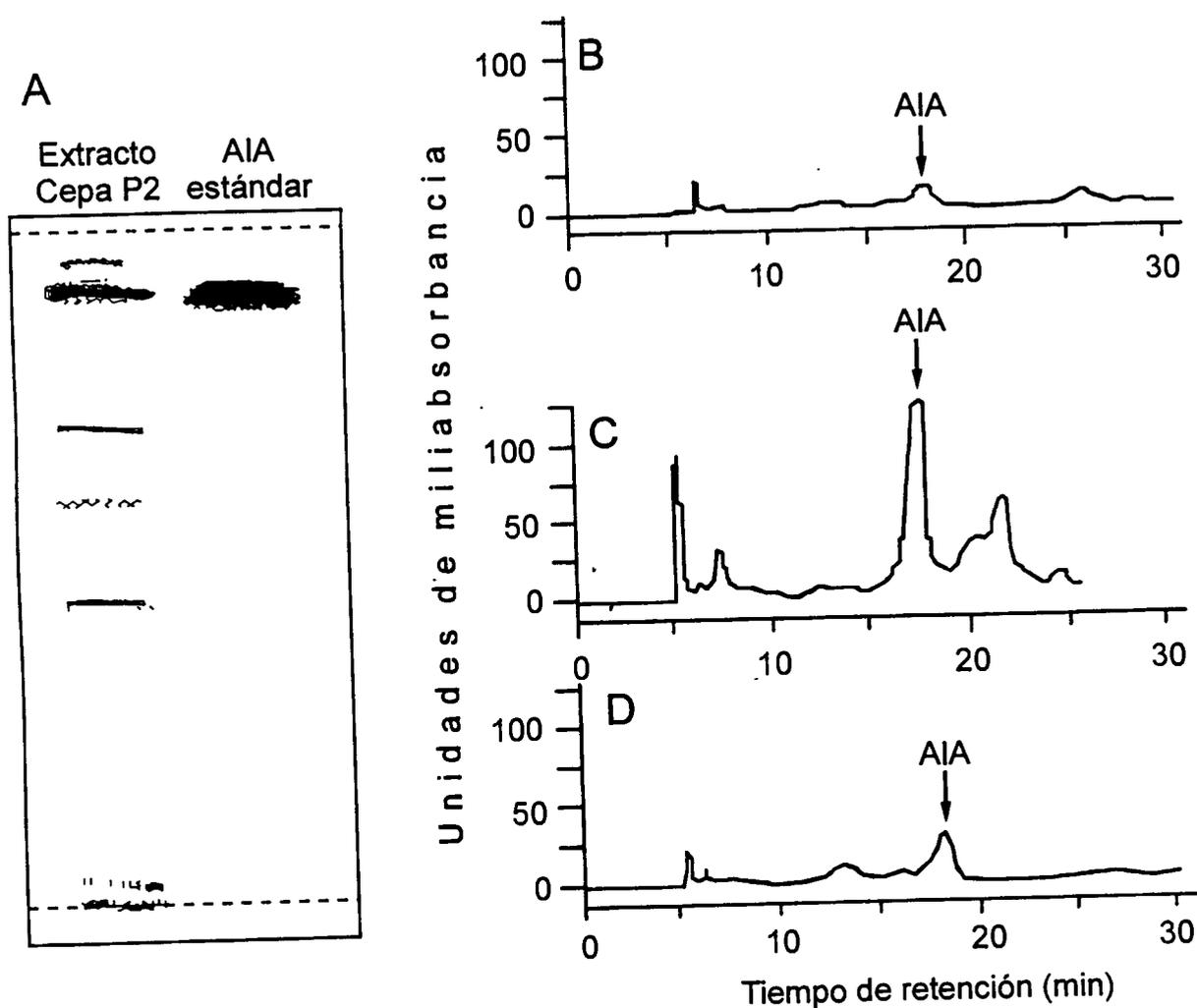


Figura 28. Separación e identificación de ácido indol-3-acético (AIA) extraído de cultivos de *Ustilago maydis* en medio mínimo de Czapek-Dox suplementado con triptófano al 0.1% (p/v). A) Cromatografía en capa fina de AIA de un extracto con acetato de etilo; B-D) HPLC de fase reversa de extractos en acetato de etilo correspondientes a las cepas FB1 (B), P2 (C) y T5 (D). Las flechas indican el tiempo de retención del AIA estándar.

otras cepas haploides aisladas de huitlacoche sin poder encontrar una sola a la que se le pudiera determinar su tipo de apareamiento, por lo que estas cepas no fueron incluidas en análisis posteriores.

En base a lo anterior, se utilizaron las cepas haploides 001, 002, Bx711 y Bx722, así como las solopatógenicas D12, d132, P6D, P1 y T4 en las pruebas de infectividad en plántulas de maíz.

### 6.2.3. Pruebas de infectividad en plántulas de maíz

Para determinar el grado de infectividad de las cepas analizadas, en todas las pruebas de infección realizadas se comparó con la cruce de las cepas silvestres de laboratorio 001 x 002, por presentar ésta una alta infectividad en experimentos anteriores.

Las tres cruces probadas que involucraron a las cepas haploides (Figura 29), mostraron una infectividad alta; de hecho la cruce 002 x Bx722 fue más infectiva que la 001 x 002. En vista de que las cepas 002 y Bx722 se consideran cepas casi isogénicas, éstas fueron seleccionadas para ser transformadas con el gen *iaaL*, por presentar además una infectividad alta (cruce) y una producción elevada de AIA de las cepas individuales.

En la Figura 30 se muestra la agresividad de las cepas solopatógenicas D12 d132 y P6D. La primera fue ligeramente más agresiva que la d132, pero ambas tuvieron menor infectividad que la cruce 001 x 002. La alta infectividad encontrada para las cruces de las cepas haploides concuerda con lo reportado por Christensen (1963) respecto a que la virulencia de las cepas haploides es más conservada que la de las cepas solopatógenicas. Por otro lado, la cepa P6D (Figura 30) resultó muy poco infectiva, al igual que las cepas P1 y T4. Resulta interesante observar que aunque la cepa d132 produjo AIA a mayor velocidad y en niveles ligeramente mayores que la D12, ambas presentaron aproximadamente la misma capacidad infectiva, siendo la de esta última incluso un poco mayor. Asimismo, aunque las cepas P1 y particularmente la T4 produjeron altos niveles de AIA, presentaron infectividades mucho menores que las de D12 y d132.

En base a estos resultados, las cepas P6D, P1 y T4 fueron descartadas de los experimentos de transformación posteriores. Por lo tanto, las cepas D12 y D132 fueron seleccionadas para la transformación, aunque presentaran niveles intermedios de producción de AIA. La capacidad de infectar por sí solas representaría una ventaja con respecto a la transformación, al no requerir una cepa compatible transformada para poder observar el efecto del gen *iaaL*, tanto sobre la

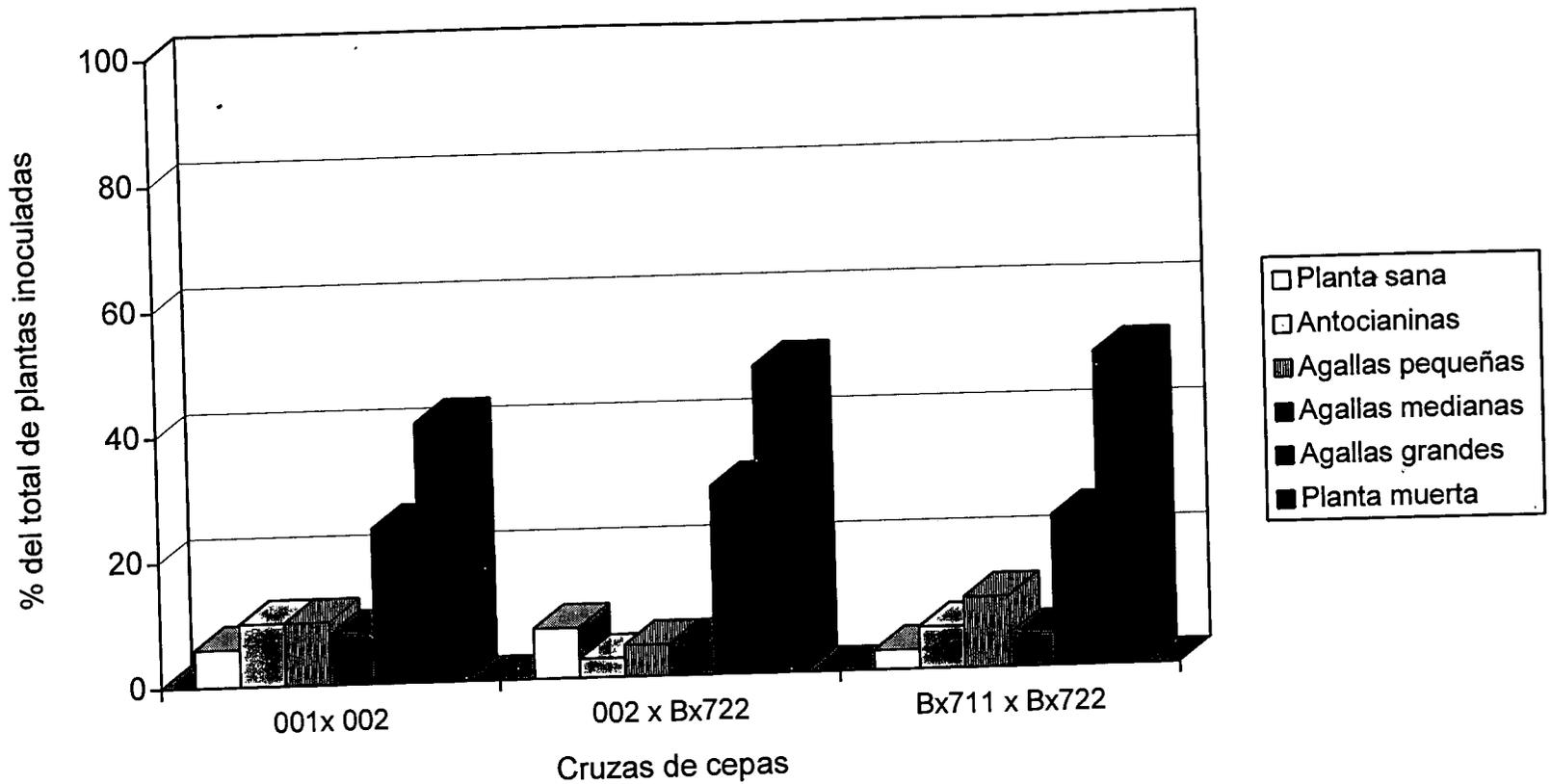


Figura 29. Capacidad de infectividad en plántulas de maíz de las cruzas de cepas haploides 001 x 002, 002 x Bx722 y Bx711 x Bx722, de *Ustilago maydis*. La inoculación y la calificación de las plantas fue completamente al azar y sin conocimiento de la identidad de las cruzas/cepas, habiendo utilizado un promedio de 150 plantas por crusa.

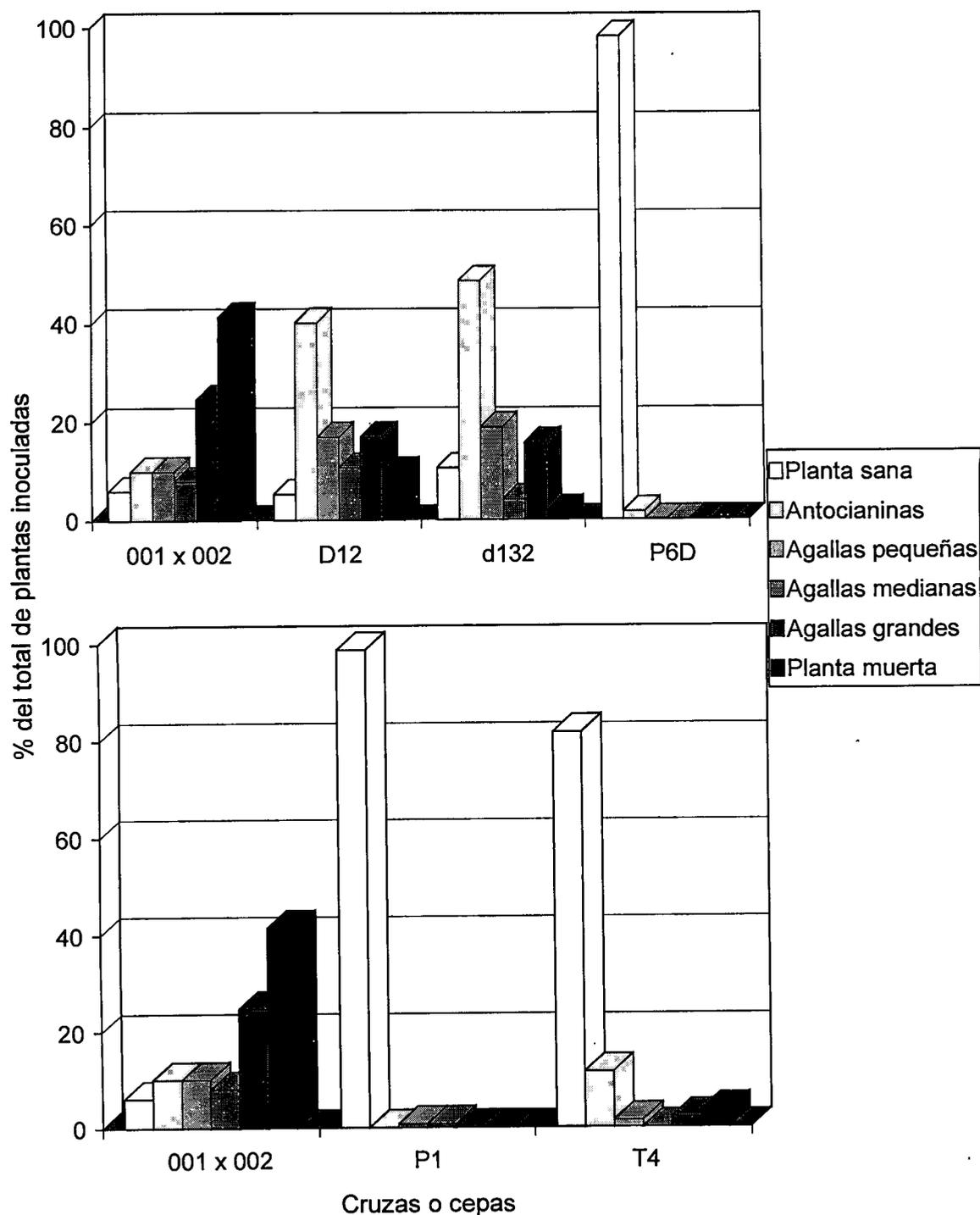


Figura 30. Capacidad infectiva en plántulas de maíz de tres cepas solopatogénicas de laboratorio (D12, d132 y P6D) y de dos cepas solopatogénicas aisladas de huitlacoche (P1 y T4), comparadas con la cruz de cepas haploides 001 x 002, de *Ustilago maydis*. La inoculación y la calificación de las plantas fue completamente al azar y sin conocimiento de la identidad de las cruzas/cepas, habiendo utilizado un promedio de 150 plantas por cruz.

producción de AIA *in vitro* como sobre la formación de tumores en planta.

Se ha reportado que cepas patogénicas y no patogénicas de *Xanthomonas* tienen igual capacidad de producción de AIA; incluso algunas cepas mutantes no patogénicas de *Pseudomonas solanacearum* producen niveles mayores de AIA que las cepas nativas (Fet y col., 1987). De las cepas de *U. maydis* analizadas, las cepas FB1, FB2 y 001 mostraron producciones menores de AIA; sin embargo la cruce entre 001 y 002, por ejemplo, mostró una alta capacidad infectiva. Por otro lado, varias de las cepas aisladas de huitlacoche produjeron niveles considerables de AIA, pero no fueron capaces de aparearse *in vitro*. Esto parece confirmar la sugerencia de que el AIA no es el único factor en la virulencia (Roberto y col., 1990). Al respecto, Yamada (1993) reportó que la hipertrofia en las células de los tumores en plantas es debida a una alta relación auxina/citocininas producidas por el patógeno, que alteran el balance hormonal en las células. En bacterias del género *Pseudomonas* que no causan hipertrofia, el nivel de producción de AIA es más bajo que el de las bacterias del mismo género que sí la causan; sin embargo dicha producción baja de AIA provoca una susceptibilidad de la planta a los patógenos y reprime respuestas de defensa como quitinasas, proteinasas o alcaloides. En maíz, se ha visto que la aplicación de auxinas exógenas susceptibiliza al ataque por *Helminthosporium* y en tabaco al virus del mosaico (Yamada, 1993). Esto podría explicar el hecho de encontrar cepas silvestres haploides de *U. maydis* que causan una buena infección en plantas, pero su producción de AIA es relativamente baja.

Para el propósito del presente trabajo se buscaron cepas que fueran buenas productoras de AIA además de ser altamente infectivas en maíz, para poder observar la posible disminución de AIA libre por efecto del gen *iaaL* en cepas transformadas.

Resumiendo, todas las cepas que presentaron infectividades relativamente altas en plántulas de maíz mostraron también la capacidad de producir niveles medianos o altos de AIA *in vitro*. Sin embargo, no todas las cepas que produjeron mucho AIA resultaron en una alta infectividad, probablemente debido a la incapacidad de dichas cepas de aparearse adecuadamente. Las cruces de cepas haploides fueron significativamente más infectivas que las cepas solopatogénicas. En vista de lo anterior, se escogieron las cepas 002, Bx722, D12, d132 para ser transformadas con el gen *iaaL*, a objeto de observar su efecto sobre la producción *in vitro* de AIA y sobre la patogenicidad de las cepas.

### **6.3. Obtención y análisis de cepas de *Ustilago maydis* transformadas con el gen *iaaL***

#### **6.3.1. Construcción de los vectores de *U. maydis* con el gen *iaaL***

En la Figura 31 se muestran las digestión de los plásmidos pMON690, pUBLEX1 y pUXV10. En el carril 3 aparece la digestión de pMON690 con BgIII y BamHI; el fragmento BgIII y BamHI de 1.8 kpb, que contiene al gen *iaaL*, fue cortado del gel y purificado. Este fragmento fue ligado al vector pUBLEX1 en el sitio único de clonación BgIII, e independientemente, al pUXV10 en su sitio único de clonación BamHI. En los carriles 1 y 5 de la Figura 31, se presentan las digestiones de estas construcciones, respectivamente. Debido a que la ligación del fragmento *iaaL* podía ocurrir en la orientación adecuada o no de acuerdo al promotor que permite su expresión, o bien podía ocurrir religación del vector sin inserto *iaaL*, se analizaron 29 transformantes de *E. coli* seleccionándose 6, representativas de las tres posibilidades para cada vector. La Figura 32 muestra los mapas utilizados en los análisis de restricción para predecir el patrón de corte para cada posibilidad esperada. La Figura 33 muestra el patrón de digestión con XbaI de las construcciones de los vectores pUBLEX1 y pUXV10 con el inserto *iaaL*. Esta enzima produce un fragmento de 0.65 kpb y otro de 6.45 kpb en el vector sin inserto. Cuando el inserto *iaaL* se liga en orientación incorrecta se forma un fragmento de 2.19 kpb y el de 0.65 kpb. Por otro lado, cuando se liga en orientación correcta, se obtiene un fragmento de 0.72 kpb y el mismo de 0.65 kpb. Sin embargo, en la Figura 33 en los carriles 2 y 3 del gel A, se observan algunas bandas adicionales al patrón de bandeado esperado posiblemente debidas a una digestión incompleta. El fragmento adicional en el carril 2 es de aproximadamente 3 kpb, probablemente producto de la suma del fragmento de 0.65 kpb y del fragmento de 2.19 kpb; en el carril 3 un fragmento de 1.3 kpb sería producto de la suma del fragmento de 0.717 kpb y 0.65 kpb. En contraste, las digestiones de las construcciones hechas con pUXV10 mostraron únicamente las bandas esperadas cuando el inserto *iaaL* fue ligado en orientación correcta o invertida.

#### **6.3.2. Detección de las construcciones portadoras del gen *iaaL* en el DNA total de *U. maydis* mediante análisis de Southern**

En la Figura 34A se presentan los resultados de la hibridación de DNA total extraído de las cepas transformadas de *U. maydis* utilizando como sonda el plásmido pUBLEX1 linearizado con BgIII; en este análisis algunas de las muestras de DNA genómico fueron también digeridas con BgIII para linearizar las

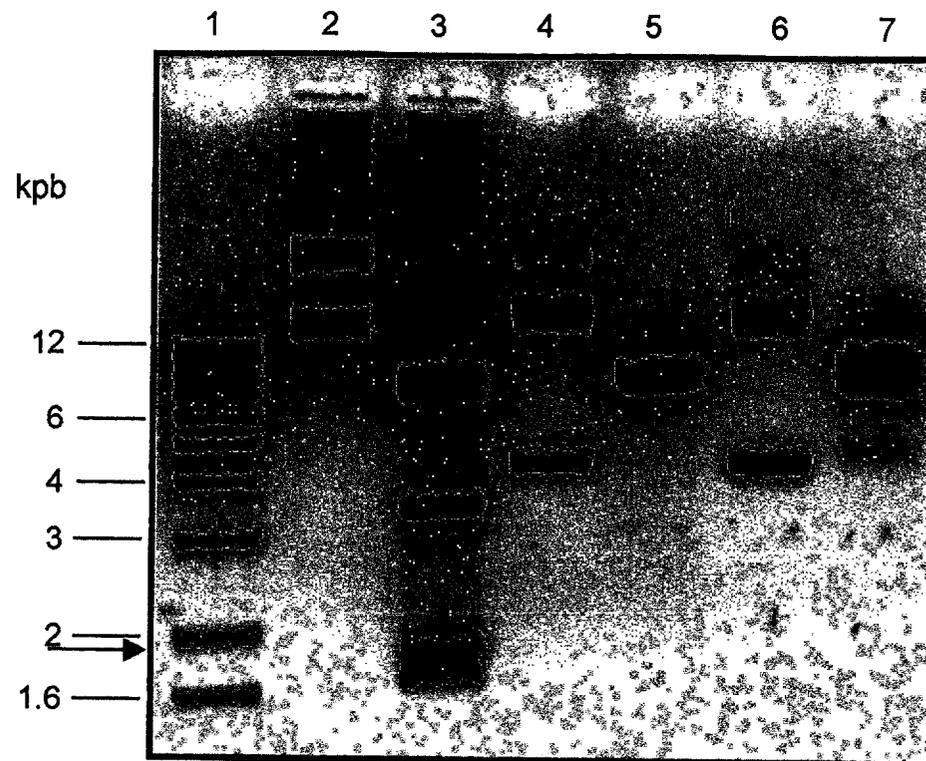


Figura 31. Digestiones de los plásmidos pMON690, pUBLEX1 y pUXV10. Carril 1: marcador de tamaño molecular, 2: pMON690, 3: pMON690 digerido con BglII y BamHI (fragmento *iaaL* de 1.8 kpb liberado), 4: pUXV10, 5: pUXV10 digerido con BamHI, 6: pUBLEX1, 7: pUBLEX1 digerido con BglII. La flecha indica el fragmento *iaaL* que fue purificado para hacer las construcciones.

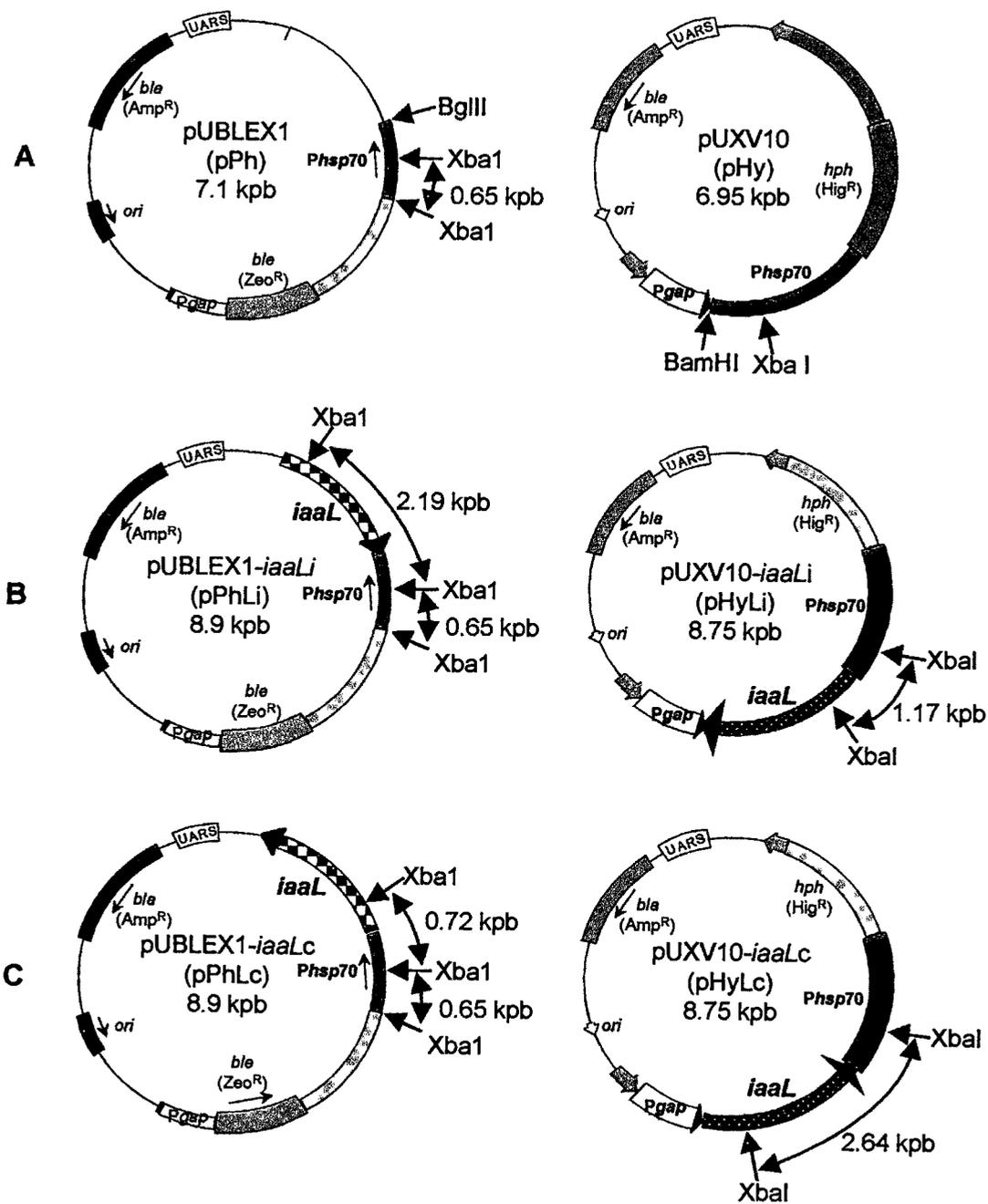


Figura 32. Mapas que muestran los patrones de corte después de digerir con la enzima XbaI a las construcciones hechas con el gen *iaaL* y los vectores de expresión de *Ustilago* pUBLEX1 y pUXV10. A) vectores sin inserto mostrando los sitios únicos de clonación (BglII y BamHI), B) construcciones con inserto *iaaL* en orientación invertida, C) construcciones con inserto *iaaL* en orientación correcta.

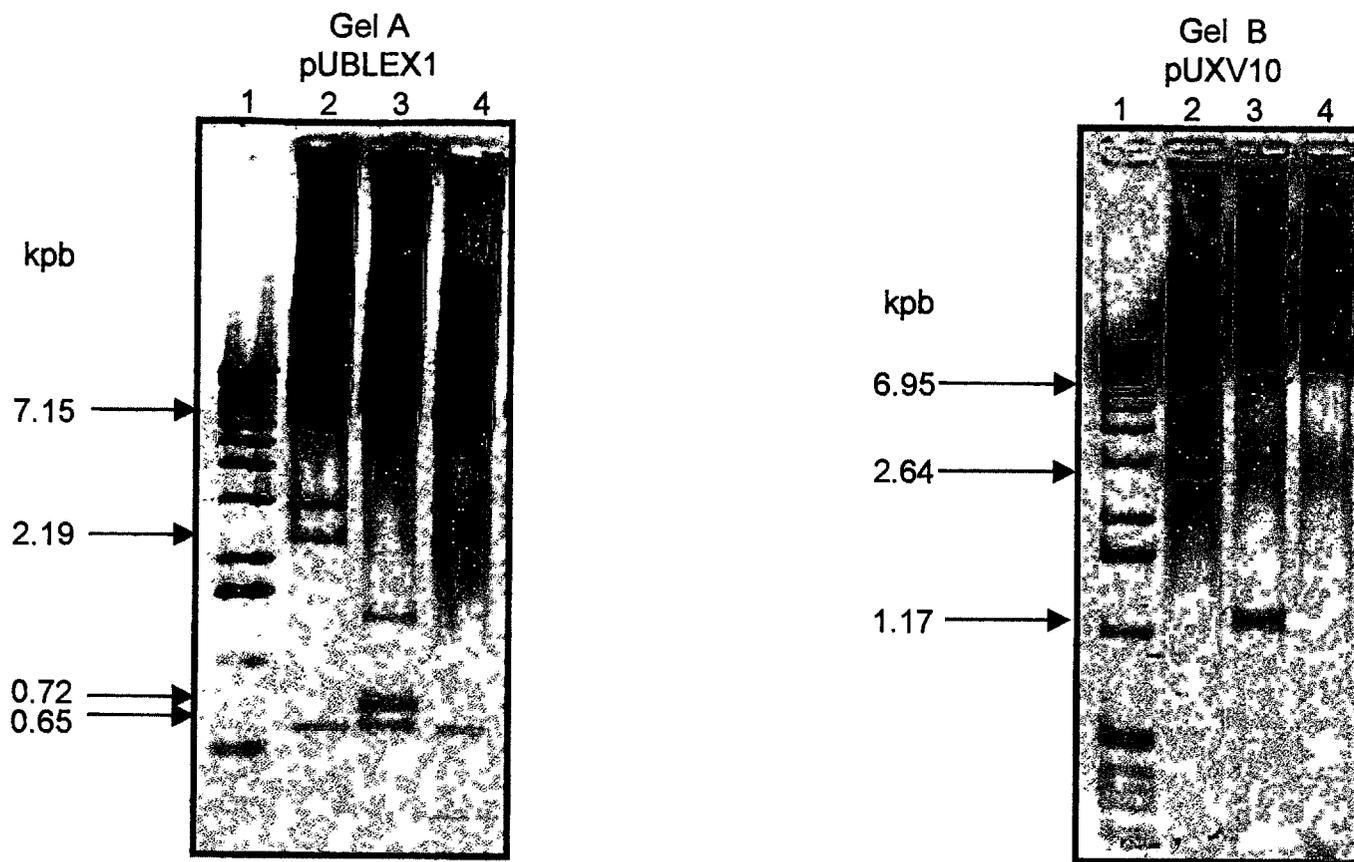


Figura 33. Análisis de restricción con XbaI de las construcciones portadoras del gen *iaaL*. Gel A) Carril 1: marcador de tamaño molecular, 2: pUBLEX1-*iaaLc*, 3: pUBLEX1-*iaaLi*, 4: pUBLEX1 sin inserto *iaaL*. Gel B) Carril 1: marcador de tamaño molecular, 2: pUXV10-*iaaLc*, 3: pUXV10-*iaaLi*, 4: pUXV10 sin inserto *iaaL*. Las flechas indican los fragmentos esperados.

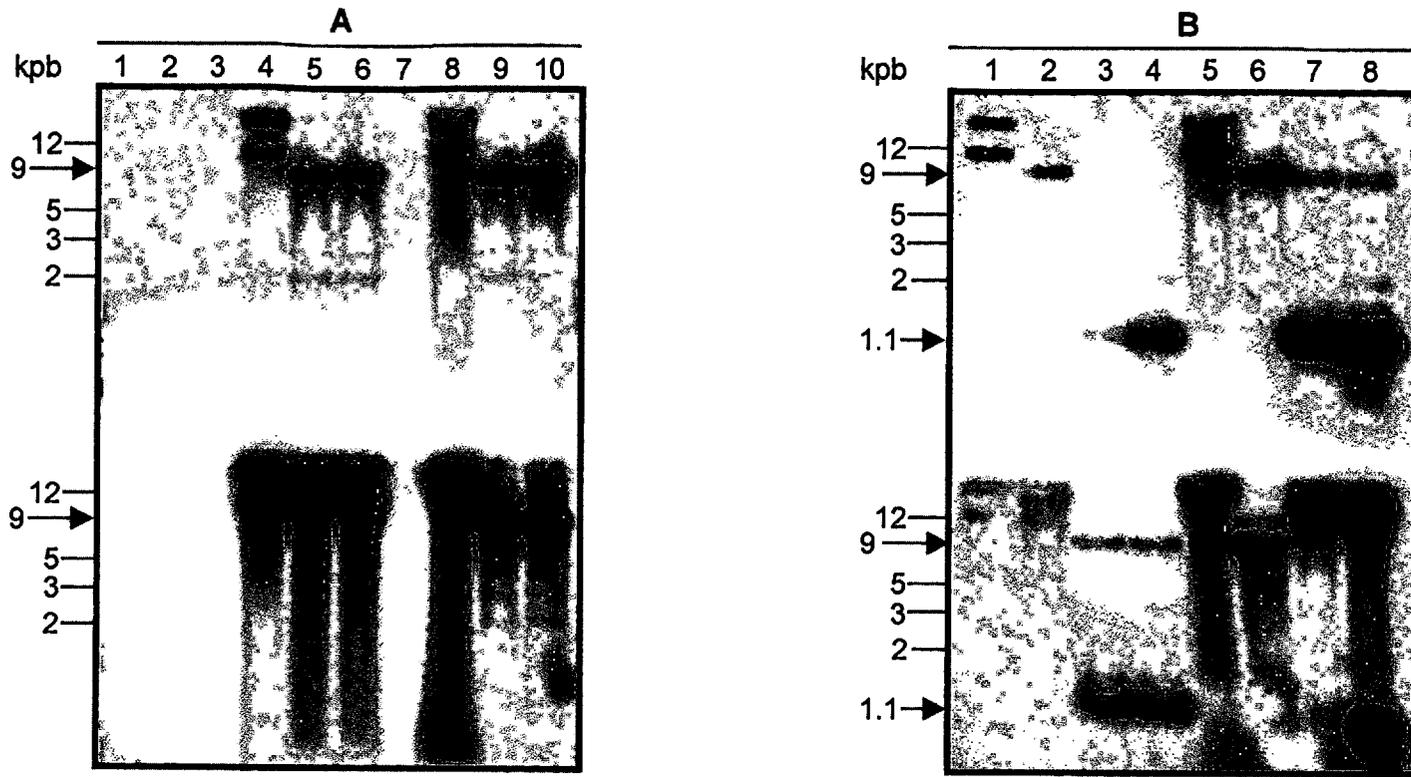


Figura 34. Hibridación (análisis de Southern) de DNA total extraído de cepas de *U. maydis* no transformadas y transformadas con el gen *iaaL*, usando como sondas al vector pUBLEX1 digerido con BglIII (A) y al fragmento BglIII-EcoRV de 1.1 kpb del gen *iaaL* (B).

A) Carriles superiores: 1: marcador de tamaño molecular, 3: Bx722 sin transformar, 4: Bx722-pPhLi, 5 y 6: Bx722-pPhLi digerido con BglIII, 8: Bx722-pPhLc, 9 y 10: Bx722-pPhLc digerido con BglIII; los carriles 2 y 7 están vacíos. Carriles inferiores: 1: marcador de tamaño molecular, 3: 002 sin transformar, 4: 002-pPhLi, 5 y 6: 002-pPhLi digerido con BglIII, 8: 002-pPhLc, 9 y 10: 002-pPhLc digerido con BglIII; los carriles 2 y 7 están vacíos.

B) Carriles superiores: 1: Bx722-pPhLi, 2: Bx722-pPhLi digerido con BglIII, 3 y 4: Bx722-pPhLi digerido con BglIII y EcoRV, 5: Bx722-pPhLc, 6: Bx722-pPhLc digerido con BglIII; 7 y 8: Bx722-pPhLc digerido con BglIII y EcoRV. Carriles inferiores: 1: 002-pPhLi, 2: 002-pPhLi digerido con BglIII, 3 y 4: 002-pPhLi digerido con BglIII y EcoRV, 5: 002-pPhLc, 6: 002-pPhLc digerido con BglIII, 7 y 8: 002-pPhLc digerido con BglIII y EcoRV.

construcciones. Se observan bandas de un tamaño molecular mayor a 9 kpb, probablemente correspondientes a diferentes formas superenrolladas del plásmido. Como se esperaba, los controles correspondientes a DNA de las cepas Bx722 y 002 sin transformar (carril 3 superior e inferior, respectivamente) no mostraron señal alguna. Los carriles superiores 5 y 6 muestran la construcción abierta con un tamaño aproximado de 9 kpb correspondiente a la muestra de DNA de la cepa Bx722-pPhLi, mientras que los carriles 9 y 10 muestran la construcción abierta en la cepa BX722-pPhLc. En los carriles inferiores 5 y 6, que corresponden a la muestra de DNA de la cepa 002-pPhLi, el DNA mostró resistencia a la digestión; esto ya ha sido reportado (Sambrook y col., 1989) para algunos casos cuando el DNA es tratado con fenol-cloroformo. Los carriles inferiores 9 y 10 muestran la construcción abierta con BgIII de la cepa 002-pPhLc, con un tamaño molecular aproximado de 9 kpb, conforme a lo esperado. Estos resultados confirman la transformación de las cepas con el vector pUBLEX1.

Finalmente, en la Figura 34B aparecen los resultados de la hibridación utilizando como sonda un fragmento BgIII-EcoRV de 1.1 kpb que contiene al gen *iaaL* casi completo (Figura 7). En las muestras de DNA genómico, se liberó un fragmento BgIII-EcoRV de aproximadamente 1.1 kpb conteniendo al gen *iaaL* el cual está señalado (flechas). Este fragmento se pudo observar claramente en el juego de cuatro cepas transformadas obtenidas, aunque en el carril inferior 7 (conteniendo DNA de 002-pPhLc), puede apreciarse que el DNA no pudo ser digerido por BgIII y EcoRV; por otro lado el carril 8 sí muestra el fragmento correspondiente de DNA debido a que dicha muestra provino de un lote distinto. Estos resultados confirman la presencia del gen *iaaL* en las cepas transformadas.

El análisis de Southern se llevó a cabo en las muestras de DNA de las cepas transformadas Bx722-pPhLi, Bx722-pPhLc, 002-pPhLi, y 002pPhLc. En resumen este análisis mostró que las cepas fueron transformadas con el gen *iaaL* y el vector de expresión pUBLEX1.

### **6.3.3. Curvas de crecimiento y de producción de AIA de las cepas transformadas con el gen *iaaL***

Es pertinente mencionar que las construcciones introducidas a las cepas de *U. maydis* contienen secuencias de replicación autónoma, por lo que se esperaría que fueran capaces de replicarse y generar copias múltiples de sí mismas (episómicas) en presencia del agente selectivo (antibiótico). En vista de lo anterior y de la facilidad de obtener transformantes episómicas (en relación a la

generación de transformantes integrativas), se diseñaron estos experimentos para poder observar algún posible efecto del gen *iaaL* sobre los niveles de AIA libre producido por el hongo *in vitro*, y la posible relación de dicho efecto con la capacidad infectiva.

#### **6.3.3.1. Cepas transformadas con el vector pUBLEX1 conteniendo el gen *iaaL***

En la Figura 35A se aprecia un crecimiento significativamente menor de la cepa transformada 002-pPhLi con respecto a la cepa 002-pPhLc, aunque tendieron a igualarse después de las 136 h de incubación. En la misma Figura se observa que existe una mayor cantidad de AIA libre en los cultivos con la cepa 002-pPhLc en las primeras 80 h de cultivo, lo cual pudo ser debido a una diferencia de crecimiento, ligeramente mayor para esta cepa al principio de la curva. Sin embargo, el efecto de la expresión del gen *iaaL* sobre los niveles de AIA libre en el medio parece observarse después de las 80 h de incubación. La reducción de la concentración de AIA libre en la cepa 002-pPhLc fue del 20% con respecto a la cepa 002-pPhLi. Las concentraciones máximas de AIA en los cultivos se alcanzaron durante la fase estacionaria, período en el cual hubo una diferencia de producción de AIA entre la cepa transformada 002-pPhLc y la cepa 002-pPhLi, y en donde también el crecimiento es similar en ambas. Aparentemente, una vez igualado el crecimiento en ambas cepas transformadas, el efecto del gen *iaaL* sobre la cepa 002-pPhLc fue más claramente observable.

En vista de que el gen *iaaL* contenido en el vector pUBLEX1, se colocó bajo el control del promotor de choque térmico de *U. maydis hsp70*, las cepas transformadas con este vector fueron sometidas a un choque térmico de 42 °C durante 10 min para observar el posible efecto de una sobreexpresión del gen *iaaL*, la cual podría resultar en una disminución de la concentración de AIA libre en los cultivos. Este tipo de inducción ya se ha llevado a cabo en células de *U. maydis* transformadas con los promotores *hsp70* que gobiernan la expresión de genes de resistencia a higromicina (Holden y col., 1989). En dichos trabajos los niveles de transcrito aumentaron cinco veces con respecto a los controles, alcanzando este máximo a las 2 h después del tratamiento (Holden y col., 1989).

En la Figura 35B se presentan los efectos de los tratamientos de choque térmico sobre las cepas 002-pPhLi y 002-pPhLc. La menor producción de AIA por parte de la cepa 002-pPhLi con y sin choque térmico, aparentemente se debió a un crecimiento menor con respecto a la cepa 002-pPhLc. La cepa 002-pPhLi sometida a choque térmico no mostró cambios significativos en la producción de AIA con

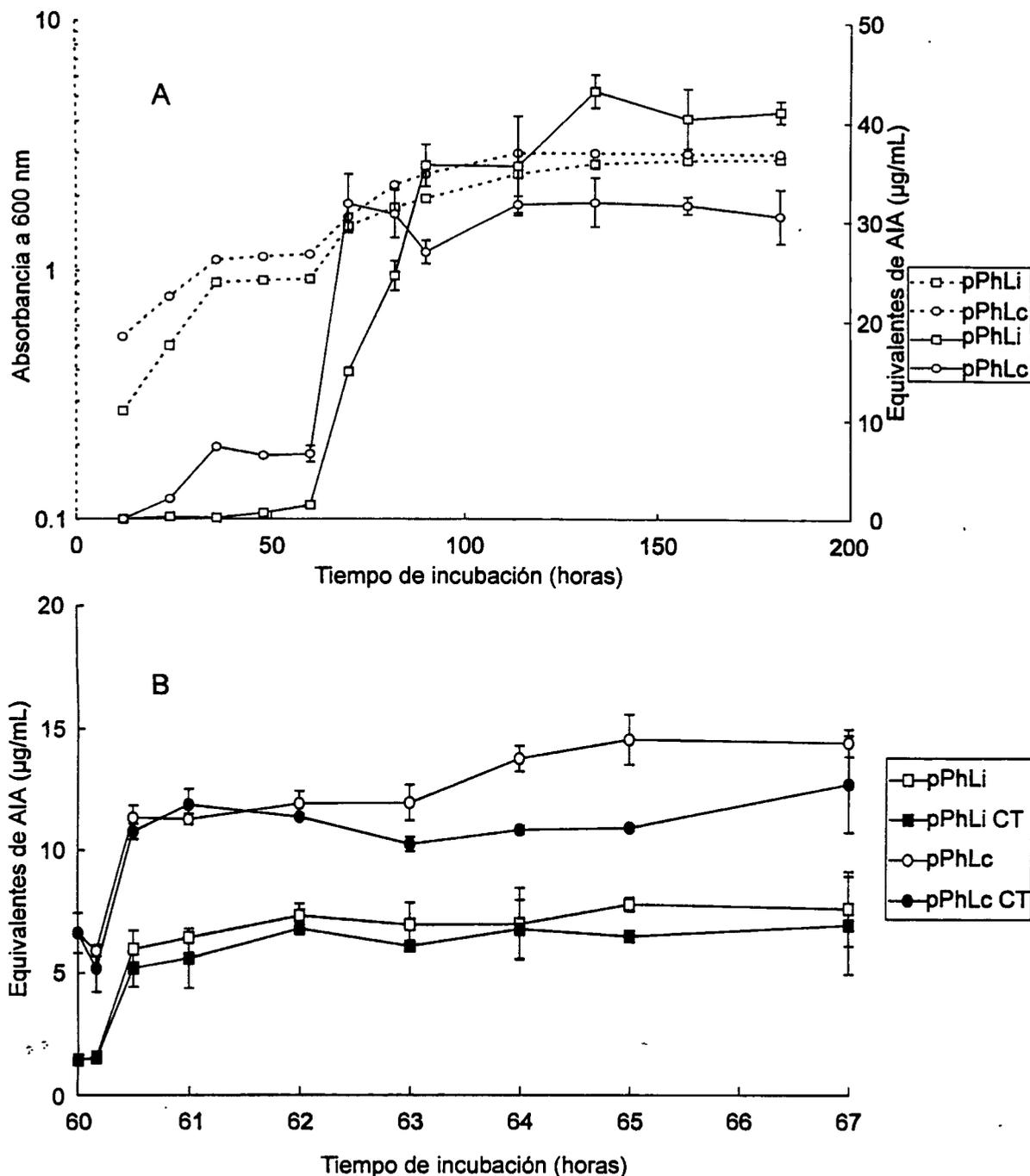


Figura 35. A) Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepa silvestre de *Ustilago maydis* 002 transformada con el vector pUBLEX1 conteniendo el gen *iaaL*. B) Curvas de producción de AIA después de un choque térmico a las 60 h de incubación. CT indica los cultivos a los que se aplicó el choque térmico de 42 °C por 10 min. pPhLi: gen *iaaL* en orientación invertida; pPhLc: gen *iaaL* en orientación correcta. Los cultivos se hicieron en caldo papa-dextrosa conteniendo 0.25% (p/v) de L-triptofano, 0.25% (p/v) de L-lisina, y 200 µg/mL de zeocina. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA fueron cuantificados mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones ± desviación estándar.

respecto a la cepa sin choque. Sin embargo, en la cepa 002-pPhLc sí hubo diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) por el efecto del choque térmico a las 3, 4, y 5 h después del tratamiento; las reducciones de los niveles de AIA libre fueron de 14.4, 21.5 y 25.0%, respectivamente. Debido a que esta reducción de AIA libre se presenta solamente en la cepa 002-pPhLc y no en la 002-pPhLi, el efecto puede ser atribuido a la inducción térmica de la sobreexpresión del gen *iaaL*, aunque en la cepa 002 la expresión constitutiva del gen *iaaL* redujo en un 20.3% los niveles máximos de AIA libre (Figura 35A).

En la Figura 36A se observa el crecimiento de las cepas transformadas Bx722-pPhLi y Bx722-pPhLc, presentando la primera una tasa de crecimiento menor durante la fase exponencial, aunque el crecimiento fue similar a partir de las 60 h de incubación, al iniciar la fase estacionaria. Se aprecian también las diferencias en producción *in vitro* de AIA entre las cepas Bx722-pPhLi y Bx722-pPhLc. Puede verse que los niveles máximos de AIA se presentaron en la fase estacionaria, aunque la tasa de producción máxima de AIA se desarrolló hacia el final de la fase logarítmica de crecimiento. La cepa transformada con el gen *iaaL* en orientación invertida (Bx722-pPhLi), produjo más AIA que la cepa Bx722-pPhLc (Figura 36A), transformada con el gen *iaaL* en orientación correcta, e incluso produjo más que la cepa sin transformar (Figura 26). Este aumento se atribuye a que el medio usado para cultivar las cepas transformadas contenía mayores niveles de L-triptofano (0.25% p/v). La cepa Bx722-pPhLc mostró una reducción de un 80% en la concentración de AIA libre con respecto a la cepa Bx722-pPhLi, efecto atribuido a la expresión del gen *iaaL*. Es importante notar que no se observaron diferencias significativas de crecimiento entre las cepas que pudieran influir en la producción de AIA (Figuras 26 y 36A). El crecimiento en ambas cepas transformadas fue vigoroso y comparable al de la cepa sin transformar, a pesar de haber crecido en un medio con el antibiótico de selección (zeocina). En estas cepas transformadas, el efecto del gen *iaaL* sobre los niveles de AIA libre fue más contundente comparado con la cepa 002 transformada.

El efecto de reducción en la concentración de AIA libre en cultivos *in vitro* fue notado por Glass y Kosuge (1988), en cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* aisladas de agallas de olivo, (las cuales no poseen actividad de indol-3-acetil-lisina sintetasa), transformadas con el gen *iaaL*. En dicho trabajo se observó una reducción de un 30% en los niveles de AIA libre por efecto del gen.

La producción disminuida de AIA por parte de la cepa Bx722-pPhLc en toda la curva, sugiere que existe una expresión constitutiva del gen *iaaL*, aún

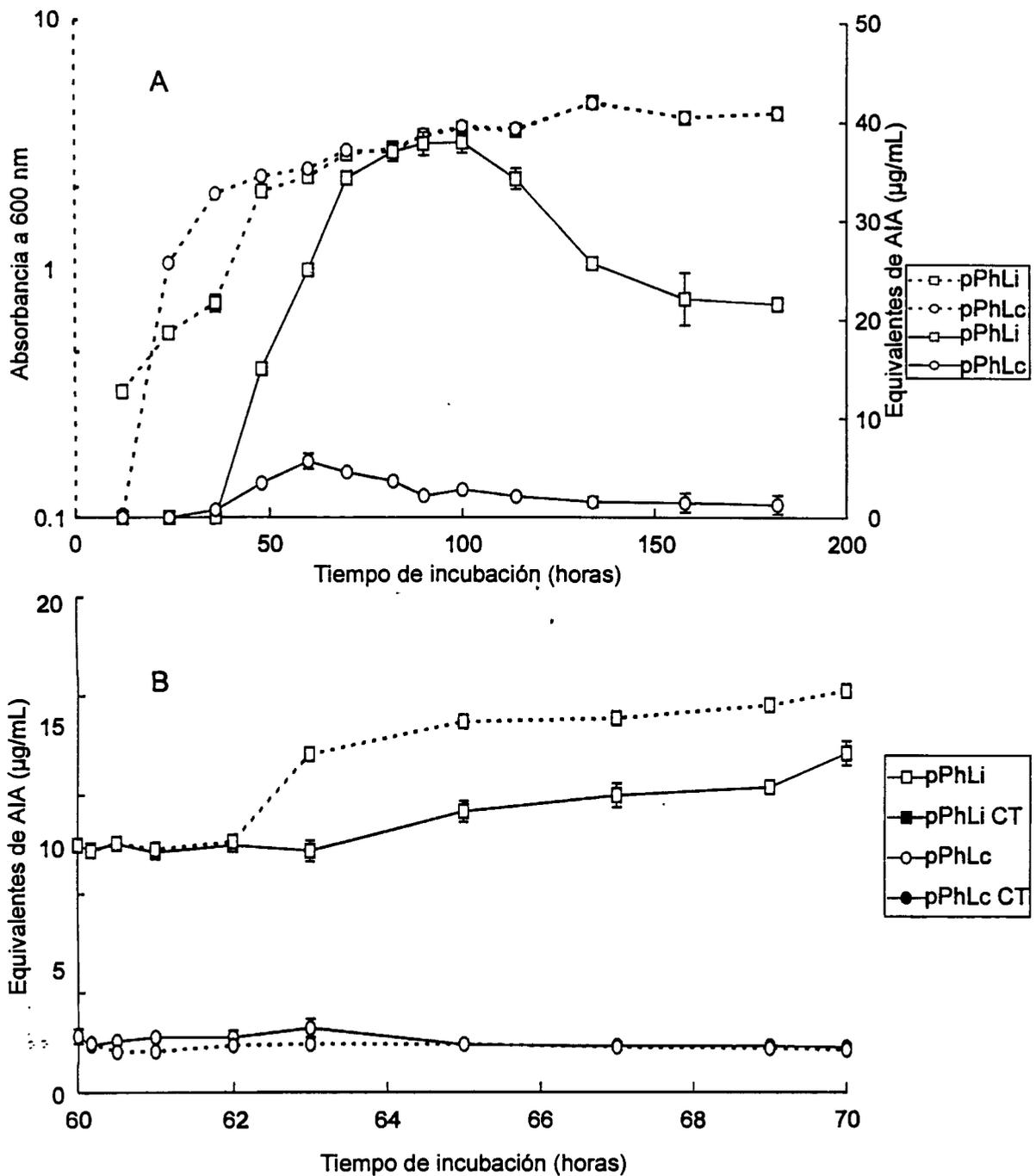


Figura 36. A) Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de la cepa casi isogénica de *Ustilago maydis* Bx722 transformada con el vector pUBLEX1 conteniendo el gen *iaaL*. B) Curvas de producción de AIA después de un choque térmico a las 60 h de incubación. CT indica los cultivos a los que se aplicó el choque térmico de 42 °C por 10 min. pPhLi: gen *iaaL* en orientación invertida; pPhLc: gen *iaaL* en orientación correcta. Los cultivos se hicieron en caldo papa-dextrosa conteniendo 0.25% (p/v) de L-triptofano, 0.25% (p/v) de L-lisina, y 200 µg/mL de zeocina. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA fueron cuantificados mediante el reactivo de Salkowski según Gordón y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones ± desviación estándar.

encontrándose éste bajo el promotor inducible por choque térmico *hsp70* en el vector pUBLEX1. Se ha visto que algunos genes *hsp70* son activos durante el crecimiento y desarrollo del organismo, cumpliendo una función adicional a respuestas de estrés o termotolerancia (Holden y col., 1989). La imposibilidad de encontrar esporidias segregantes mutantes en las secuencias de los alelos de los genes *hsp70* en *U. maydis* indica que estos genes son esenciales para el crecimiento (Holden y col., 1989).

En la Figura 36B se muestra el efecto de la inducción por choque térmico de las cepas transformadas Bx722-pPhLi y Bx722-pPhLc. Para esta última se observó una disminución significativa ( $\alpha=0.05$ ) de la concentración de AIA libre con respecto a la misma cepa sin choque térmico, a las 0.5 y 1 h después del tratamiento; estas reducciones fueron del 21 y 25%, respectivamente. En la Figura 36B se observó una diferencia en cuanto a la producción de AIA libre durante las primeras 3 h después del choque, para desaparecer el efecto después de las 4 h. Esto concuerda con lo reportado por Holden y col. (1989), que no observó transcrito después de 4 h del tratamiento sobre células de *U. maydis* transformadas con los genes *hsp70*.

Como control se sometió al mismo tratamiento térmico a la cepa Bx722-pPhLi, en la cual se observó una mayor producción de AIA en la cepa sometida al choque térmico. Este efecto fue significativo a partir de las 3 h después de aplicar el tratamiento hasta las 10 h después del choque, último punto en que se analizó la curva. Aunque en la Figura 36B no se muestra, la concentración de AIA producida por las cepas Bx722-pPhLc y Bx722-pPhLi con y sin choque térmico, se igualó a las 40 h de incubación después del choque térmico. Estos resultados sugieren que hubo una aceleración en el metabolismo de las células sometidas al tratamiento, resultando en una mayor producción de AIA; sin embargo este efecto probablemente desapareció cuando se agotaron los nutrientes y disminuyó la tasa de crecimiento, igualándose los niveles de AIA.

El hecho de que la cepa Bx722-pPhLi sometida a choque térmico, resulte en una mayor producción de AIA con respecto a la misma cepa sin tratamiento, parece indicar que la reducción en los niveles de AIA libre en la cepa Bx722-pPhLc sometida al mismo tratamiento se debe al efecto de la expresión del gen *iaaL*.

Estos resultados indican que el gen *iaaL* se expresó bajo el promotor *hsp70* de *Ustilago* en el vector pUBLEX1, siendo la expresión constitutiva la que aparentemente tuvo mayor efecto que la expresión inducible para disminuir la concentración de AIA libre en cultivos *in vitro* de las cepas transformadas.

### 6.3.3.2. Cepas transformadas con el vector pUXV10 conteniendo el gen *iaaL*

En lo que respecta a las cepas 002-pHyLi y 002-pHyLc, el crecimiento de ambas fue muy similar durante toda la curva (Figura 37A). En sus curvas de producción de AIA, en 002-pHyLc no se observó reducción en la concentración de AIA libre con respecto a 002-pHyLi, considerada como cepa control, sugiriendo que no hubo efecto observable del gen *iaaL* sobre los niveles de AIA libre; esto podría deberse a una baja expresión del gen por el promotor constitutivo que lo controla (*gap*) y que pareció ser relativamente débil. Sin embargo, Kinal y col. (1991) reportaron una alta eficiencia del promotor *gap* en células de *Ustilago maydis*, en vista de la alta actividad letal conferida por la expresión de genes virales bajo dicho promotor. A pesar de ello, en el presente trabajo se observó un menor efecto sobre los niveles de AIA libre cuando el gen *iaaL* fue colocado bajo el control de tal promotor, en relación al efecto observado con las construcciones derivadas del vector pUBLEX1, en el cual el gen *iaaL* fue colocado bajo el control del promotor constitutivo e inducible por choque térmico *hsp70*. Experimentos posteriores deberán incluir el análisis de la expresión (síntesis de RNA mensajero) del gen *iaaL* bajo los dos promotores mencionados, a objeto de corroborar los efectos observados.

En la Figura 37B se muestran las curvas de crecimiento y de producción de AIA de las cepas transformantes Bx722-pHyLi (cepa control) y Bx722-pHyLc. El crecimiento de ambas cepas transformadas fue muy similar durante toda la curva, al igual que para las cepa 002 transformada con las mismas construcciones; esto indica que las diferencias entre los niveles de AIA producidos por las cepas control y las transformadas con la construcción pHyLc pueden ser atribuibles al gen *iaaL*.

De manera general, el crecimiento de las cepas transformadas con los vectores pPhLc y pHyLc fue similar al de las cepas control transformadas con pPhLi y pHyLi. Comparando con las mismas cepas no transformadas, el crecimiento fue menor posiblemente debido a la presión ejercida por los antibióticos, a pesar de haber crecido en un medio suplementado con L-triptofano y L-lisina. Debido a las diferencias en composición del medio empleado en el crecimiento de las cepas transformantes, no sería posible comparar resultados con los de la cepa no transformada.

El gasto energético extra que puede representar para la célula la presencia de las construcciones y que pudiera influir sobre el crecimiento, afectando de esa manera la producción de AIA (y no por efecto del gen *iaaL*), era esperado que se manifestara en las cepas control transformadas, que contienen el gen *iaaL* en

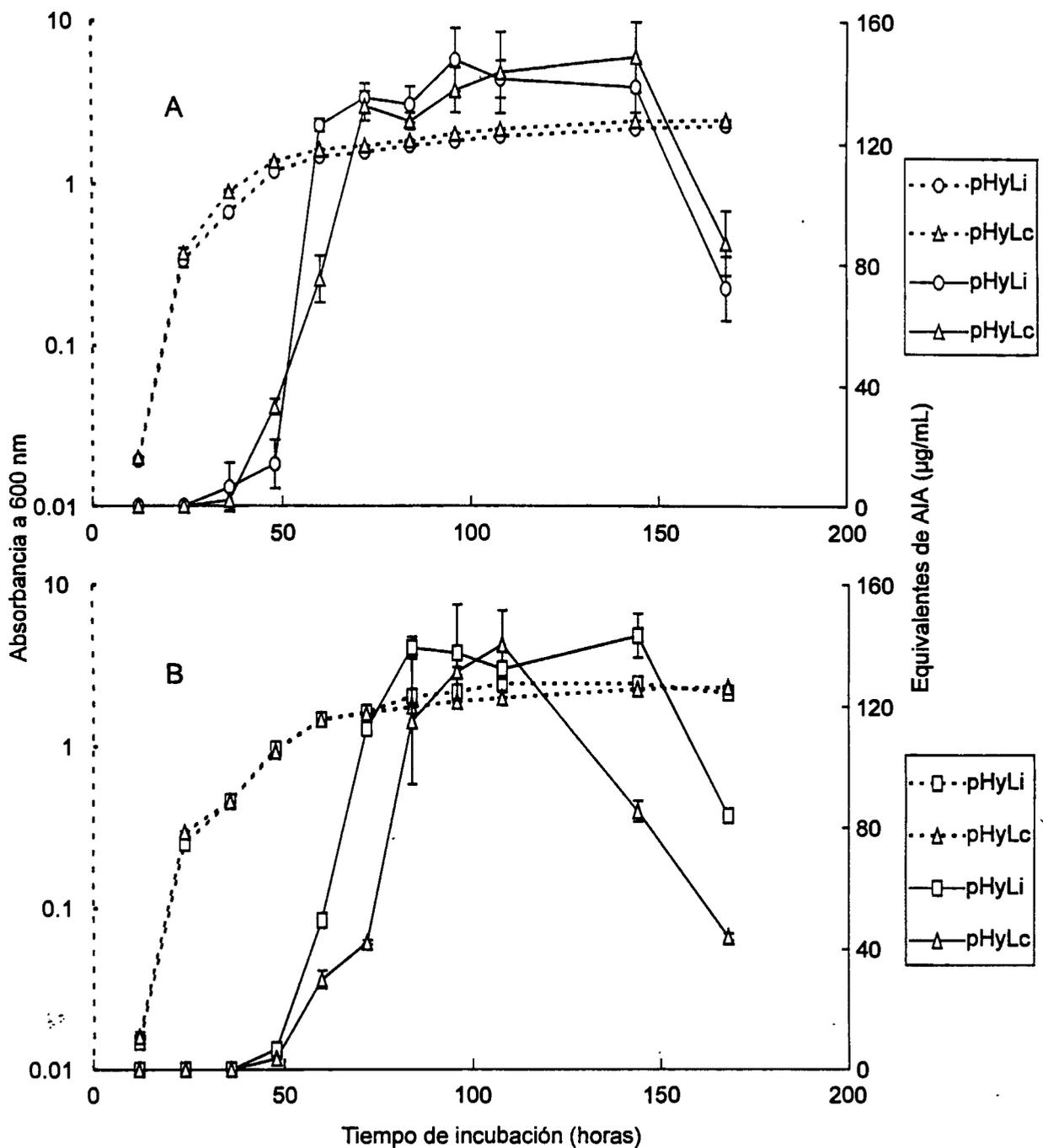


Figura 37. Curvas de crecimiento y de producción de ácido indol-3-acético (AIA) de las cepas 002 (A) y Bx722 (B) de *Ustilago maydis* transformadas con el vector pUXV10 conteniendo el gen *iaaL*.

pHyLi: gen *iaaL* en orientación invertida; pHyLc: gen *iaaL* en orientación correcta. Los cultivos se hicieron en caldo papa-dextrosa conteniendo 0.25% (p/v) de L-triptofano, 0.25% (p/v) de L-lisina, y 200 µg/mL de higromicina B. Las líneas punteadas corresponden a la absorbancia a 600 nm y las líneas continuas a los equivalentes de AIA. Los equivalentes de AIA fueron cuantificados mediante el reactivo de Salkowski según Gordon y Weber (1951). Se muestran medias de cuatro repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

orientación incorrecta. De ahí que se seleccionaron dichas cepas como controles y no cepas con el vector sin inserto *iaaL*, originalmente construidas con las cepas solopatogénicas D12 y D132 (Cuadro 4).

En cuanto a la producción de AIA (Figura 37B) la cepa Bx722-pHyLc produjo menos AIA que la cepa control (Bx722-pHyLi) antes de las primeras 80 h, siendo significativas las reducciones del 39.2% y del 62.5% a las 60 y 72 h de incubación respectivamente; después de esos tiempos no hubo diferencias significativas entre ambas cepas. Sin embargo, a partir del máximo nivel de AIA observado a las 108 h para la Bx722-pHyLc, la concentración de AIA descendió rápidamente, en comparación con la cepa control. Además el crecimiento de ambas cepas fue semejante, indicando que las diferencias encontradas en cuanto a la concentración de AIA libre son posiblemente debidas al gen *iaaL*. En el vector pUXV10, la expresión constitutiva del gen *iaaL* bajo el promotor *gap* parecería ser suficiente para disminuir la concentración de AIA libre; sin embargo, conforme aumentó la concentración de AIA, la expresión aparentemente resultó insuficiente, permitiendo alcanzar niveles máximos de AIA similares a los de la cepa control. Estos niveles máximos de AIA fueron mantenidos durante un menor tiempo en cultivos de la cepa Bx722-pHyLc, posiblemente por un efecto sumado de la expresión del gen *iaaL* y la disminución de la tasa de producción de AIA por el cultivo.

Ambos vectores utilizados (pUBLEX1 y pUXV10) mostraron tener una alta eficiencia de transformación, obteniéndose un gran número de transformantes en cada lote de transformación. Dicha eficiencia ya ha sido reportada por Gold y col. (1994) y Kinal y col. (1991), aunque la eficiencia del promotor fue evidentemente superior en el vector pUBLEX1, particularmente en la cepa Bx722, siendo la expresión constitutiva e inducible en este vector la de mayor efecto.

En cuanto a las cepas, parece claro que la cepa Bx722 presentó los mayores efectos sobre la producción de AIA *in vitro*, a pesar de que esta cepa y la 002 se consideran casi isogénicas, lo que supondría un comportamiento similar.

Aún así, los resultados sugieren que hubo una disminución de la concentración de AIA libre en ambas cepas transformadas, atribuible a la conjugación del AIA por efecto del gen *iaaL*.

#### **6.3.4. Pruebas de infectividad de las cepas transformadas con el gen *iaaL***

##### **6.3.4.1. Cepas haploides 002 y Bx722**

En el Cuadro 10 se muestran los resultados de las pruebas de infectividad

Cuadro 10. Calificaciones de síntomas de infección producidos por cruza de cepas silvestres (sin transformar) y transformadas de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz.

Cruza o cepa	Construcción	Número de plantas que presentaron los síntomas <sup>1</sup> (% del total de plantas inoculadas)					Número total de plantas inoculadas	Media <sup>2</sup>	
		0	1	2	3	4			5
002 x Bx722 (silvestres)		6 (3.9)	ND <sup>3</sup>	3 (2.0)	1 (0.7)	37 (24.2)	106 (69.3)	153 (100)	4.46 a
	pPhLi	45 (24.1)	ND	34 (18.2)	36 (19.3)	48 (25.7)	24 (12.8)	187 (100)	2.62 c
	pPhLc	78 (41.5)	ND	42 (22.3)	33 (17.6)	32 (17.0)	3 (1.6)	188 (100)	1.74 d
	pHyLi	11 (7.3)	ND	4 (2.7)	4 (2.7)	8 (5.3)	123 (82.0)	150 (100)	4.45 a
	pHyLc	33 (18.9)	ND	9 (5.1)	14 (8.0)	69 (39.4)	50 (28.6)	175 (100)	3.34 b
D12 (silvestre)		17 (20.2)	32 (38.1)	25 (29.8)	9 (10.7)	1 (1.2)	0 (0)	84 (100)	1.36 a
	pPh	27 (35.1)	20 (26.0)	28 (36.4)	2 (2.6)	0 (0)	0 (0)	77 (100)	1.04 b
	pPhLi	16 (17.0)	35 (37.2)	28 (29.8)	15 (16.0)	0 (0)	0 (0)	94 (100)	1.45 a
	pPhLc	10 (10.6)	39 (41.5)	39 (41.5)	6 (6.4)	0 (0)	0 (0)	94 (100)	1.44 a

<sup>1</sup> Síntomas: 0) no hay síntomas de infección, 1) producción de antocianinas (pigmento rojo), 2) agallas pequeñas y/o escasas en hojas y/o tallo, 3) agallas medianas y/o medianamente abundantes en hojas y/o tallo, 4) agallas grandes y/o muy abundantes en hojas y/o tallo, 5) planta muerta con síntomas severos de infección.

<sup>2</sup> Dentro de la misma cruce/cepa, las medias con letra diferente son significativamente diferentes según la prueba de Student-Newman-Keuls ( $\alpha=0.05$ ).

<sup>3</sup> ND: No determinado.

para las cruzas entre las cepas 002 y Bx722, sin transformar y transformadas. Se observó una disminución en la infectividad de la craza transformada con el vector pPhLc, con respecto a la craza transformada con el vector pPhLi. En la primera, la proporción de plantas con síntomas leves de infección fue mayor, comparado con la craza control (pPhLi), y con la craza de cepas sin transformar. Por otro lado, para la craza con el vector pPhLi, la infección desarrollada no fue tan agresiva como para la craza de cepas sin transformar, lo cual sugiere que la transformación por sí sola tuvo un efecto, disminuyendo la capacidad de las cepas de desarrollar la infección. Por lo tanto, el efecto observado en la craza de las cepas transformadas con el vector pPhLc puede deberse a los efectos combinados de la transformación y de la expresión del gen *iaaL*. A pesar de esto, la reducción en la capacidad infectiva observada entre la craza de cepas transformadas con la construcción pPhLc, respecto a la craza pPhLi, es atribuible a la presencia y expresión del gen *iaaL*. En las Figuras 38 y 39, se puede apreciar el aspecto de una muestra representativa de las plántulas infectadas en este experimento. Claramente se observa una disminución de la infectividad para la craza de cepas transformada con el gen *iaaL* en orientación correcta (Figura 39C), aún y cuando en su mayoría las plantas presentaron un cierto grado de infección. Esta reducción de infectividad concuerda con la disminución observada en los niveles de AIA libre sintetizado *in vitro*, particularmente para la cepa Bx722. Esto sugiere que la presencia del gen *iaaL* en las cepas transformadas, la cual provocó una disminución del AIA producido *in vitro*, también influyó significativamente sobre la capacidad de producción de AIA libre por el hongo dentro de las plántulas de maíz, disminuyendo sensiblemente el grado de infectividad de las cepas transformadas con el gen *iaaL* en orientación correcta, con respecto a las cepas que llevan el gen en orientación invertida. A este respecto, cabe mencionar que las construcciones portadoras del gen *iaaL* contienen secuencias de replicación autónoma (UARS), que hacen posible la replicación de los plásmidos en las células de *Ustilago* cuando éste crece en presencia del antibiótico de selección. Lo anterior está de acuerdo con el efecto observado del gen *iaaL* sobre las curvas de producción de AIA *in vitro*, ya que dichas curvas fueron analizadas cultivando el hongo en presencia del antibiótico. Sin embargo, también se observó un efecto sobre la patogenicidad del hongo en las plantas, a pesar de que en éstas no está presente el antibiótico, por lo que se esperaría que las copias del plásmido se fueran perdiendo al progresar el crecimiento del micelio dicariótico en la planta. Esto parece sugerir que la presencia y el efecto del gen *iaaL* se mantienen durante un



Figura 38. Plántulas de maíz infectadas con la cruce de cepas 002 x Bx722 de *Ustilago maydis*. A) no inoculadas, B) inoculadas con la cruce 002 x Bx722 sin transformar.

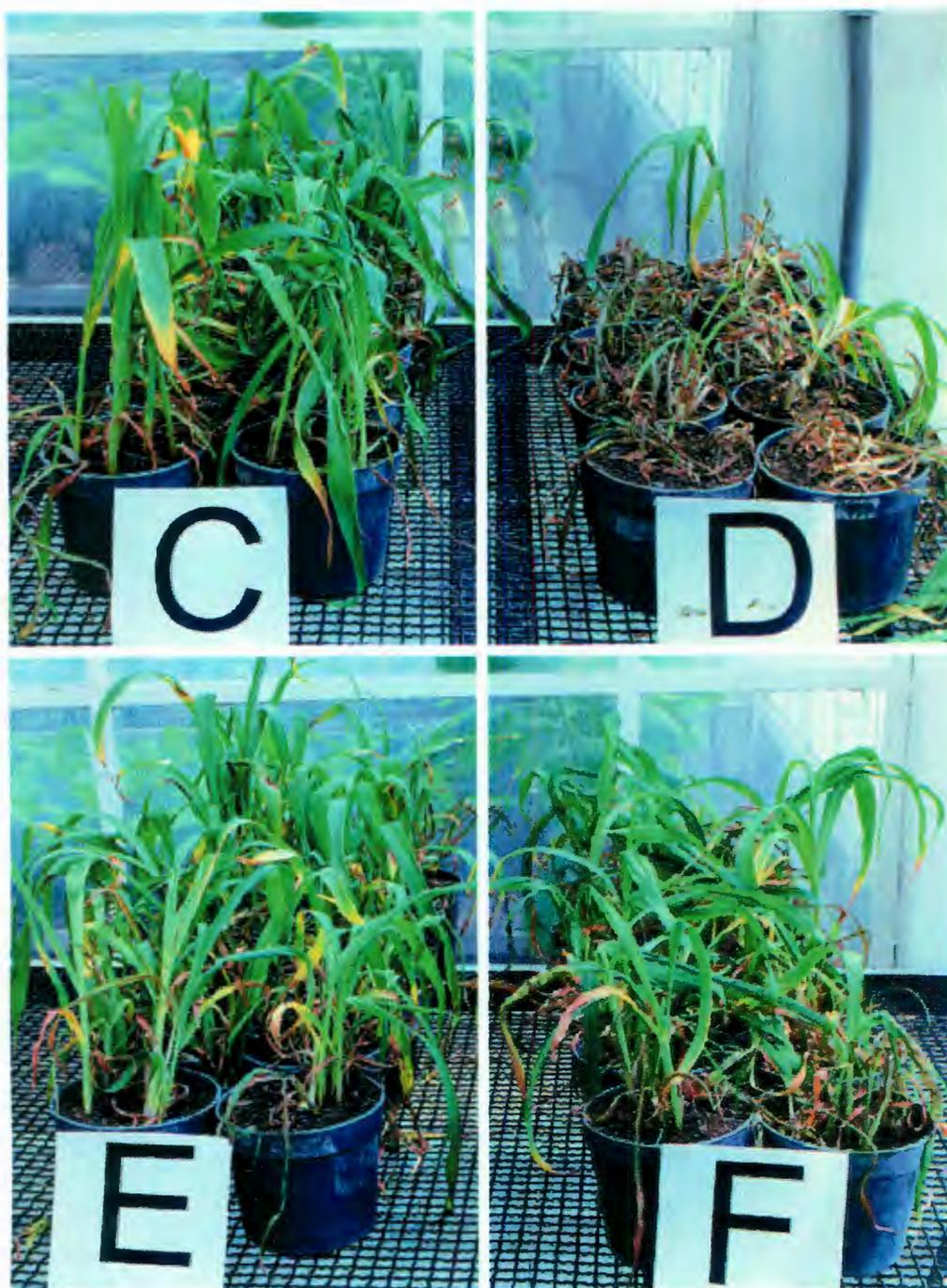


Figura 39. Plántulas de maíz infectadas con la cruce de cepas de *Ustilago maydis* 002 x Bx722 transformadas con el gen *iaaL*. C) cruce 002-pPhLc x Bx722-pPhLc, D) cruce 002-pPhLi x Bx722-pPhLi, E) 002-pHyLc x Bx722-pHyLc, F) cruce 002-pHyLi x Bx722-pHyLi.

tiempo suficiente como para afectar la producción de AIA libre y el crecimiento de los tumores en desarrollo. Estos resultados dan la pauta para realizar estudios adicionales que involucren cepas transformadas integrativamente con el gen *iaaL*, a objeto de corroborar el efecto observado en los experimentos del presente trabajo. Por otro lado, es probable que las altas temperaturas alcanzadas en el invernadero (35-36 °C) durante el desarrollo de las plántulas infectadas, hayan estimulado la actividad del promotor *hsp70* de la construcción pPhLc, contribuyendo a una posible disminución del AIA libre *in planta* (y consecuente aumento en la concentración de AIA conjugado), y sumándose al efecto de la expresión constitutiva del gen *iaaL* en esta construcción.

Por otro lado, comparando las cruza transformadas con el vector pHyLc y pHyLi (Cuadro 10), también se observó un efecto del gen *iaaL* sobre la infectividad, siendo ésta menor para la cruza transformada con el gen en orientación correcta. Aquí también se observó un desplazamiento de la proporción de plantas con síntomas más severos de infección, hacia los síntomas más leves. Con la cruza de las cepas transformadas con el vector pHyLi, la infectividad fue semejante a la de la cruza de cepas sin transformar, sugiriendo un menor efecto de la transformación en sí, en relación a la cepas transformadas con las construcciones pPhLi y pPhLc. En las Figuras 39E y 39F, se muestra el aspecto de las plantas infectadas con las cepas transformadas con las construcciones pHyLi y pHyLc; a diferencia de lo observado anteriormente para las construcciones pPhLi y pPhLc (Figuras 39C y 39D), visualmente no se observa una clara diferencia entre la cruza pHyLi y la pHyLc, aunque las medias de infectividad fueron diferentes.

Los resultados de las pruebas de infectividad analizadas indican que la transformación con el gen *iaaL* en el vector pUBLEX1 fue más efectiva para disminuir la capacidad de infección de las cepas transformadas de *U. maydis*. Estos resultados sugieren que hubo una expresión mayor del gen *iaaL*, posiblemente inducida por las altas temperaturas de invernadero (35-36 °C) en las que se llevaron a cabo los experimentos. Esto concuerda con lo reportado para la expresión constitutiva e inducible para promotores *hsp70* (Holden y col., 1989).

Los resultados también sugieren que la reducción de la infectividad en las pruebas de invernadero, fue debida al efecto sumado de la transformación de ambas cepas involucradas en la cruza, lo cual es consistente con la formación y proliferación del micelio dicariótico durante el proceso de infección.

En trabajos anteriores con el gen *iaaL* (Glass y Kosuge, 1988), se ha reportado que cuando este gen es inactivado por inserción en bacterias del género

*Pseudomonas* que contienen al gen *iaaL* en el plásmido pIAA1, las bacterias producen más AIA libre en medios de cultivo líquidos comparadas con las cepas nativas. Sin embargo, cuando estas bacterias con altos niveles de producción de AIA son inoculadas en plantas, no desarrollan una infección comparable a la cepa nativa, a pesar de producir altos niveles de AIA, y aunque posean las enzimas necesarias para obtener AIA libre a partir del conjugado. En el presente trabajo se asumió que las plantas de maíz serían incapaces de hidrolizar el enlace amídico del conjugado AIA-lisina, en vista de que este tipo de conjugado no ha sido encontrado en maíz (Bandurski y col., 1995). Asimismo, se hipotetizó que *U. maydis* tampoco sería capaz de hidrolizar el conjugado, aunque en realidad no existen estudios reportados de búsqueda y/o hallazgo de conjugados de AIA en este hongo. Los efectos observados del gen *iaaL* sobre la producción de AIA libre en cultivo y sobre la infectividad de las cepas transformadas parecen apoyar la hipótesis de que ni la planta ni el hongo son capaces de hidrolizar el conjugado AIA-lisina de manera significativa, probablemente por carecer de las enzimas necesarias para ello.

Por otra parte, el gen *iaaL* ha sido empleado para la transformación de algunas plantas; por ejemplo, en tabaco transformado con este gen se encontró una disminución en los niveles de AIA libre de 19 veces, presentando la planta disminución en el desarrollo de raíces, reducción de la dominancia apical, y enanismo generalizado, entre otros efectos (Romano y col., 1991). En papa transformada con el gen *iaaL* también se observó disminución del desarrollo de raíces, entre otros efectos (Spena y col., 1991). Estos trabajos sugieren que la formación del conjugado AIA-lisina regula la acción del AIA, alterando el balance hormonal en las plantas transformadas (Spena, 1991). En el presente trabajo posiblemente también se presentó un desbalance del AIA producido por *U. maydis* en el desarrollo de la infección en maíz, aceptando de antemano que el AIA está involucrado en la infectividad del hongo.

En resumen, la información obtenida apoya la hipótesis de que el AIA producido por el hongo está directamente relacionado con la formación de tumores en las plántulas de maíz, y parece no haber una contribución significativa por parte de la planta hacia este fenómeno.

#### **6.3.4.2. Cepas solopatógenicas D12 y D132**

En la Cuadro 10 se muestran los resultados de las pruebas de infectividad de la cepa D12 sin transformar y transformada. A diferencia de lo observado con

las cruas de cepas haploides, en el caso de las cepas solopatógenicas no se pudo observar una disminución significativa de la infectividad en las cepas transformadas por efecto del gen *iaaL*. No se observó efecto del gen *iaaL* presente en orientación correcta en la cepa D12-pPhLc, con respecto a los controles D12-pPhLi (inserto en orientación invertida) y D12 sin transformar, aunque hubo una disminución ligera y estadísticamente significativa en la infectividad de la cepa D12-pPh (transformada sin inserto *iaaL*) con respecto a la cepa no transformada. En general, todas las cepas derivadas por transformación a partir de D12 mostraron grados similares de infectividad, y aunque resultaron resistentes al antibiótico de selección (en contraste con las no transformadas), sería necesario confirmar su transformación mediante análisis adicionales (tipo Southern, entre otros) para intentar explicar los resultados.

De manera inesperada, la cepa d132 sin transformar resultó muy poco infectiva en estos experimentos (datos no mostrados), en contraste con experimentos previamente llevados a cabo (Figura 30). Por su parte, las cepas derivadas de la d132 por transformación no fueron infectivas, presentando un 100% de plantas sin síntomas. Estas observaciones sugieren que la cepa d132 perdió por lo menos parte de su carácter de solopatógena, fenómeno que según Christensen (1963) es común para este tipo de cepas. La transformación de cepas solopatógenicas tuvo como objetivo la eliminación de la necesidad de aparear la cepa transformada con otra cepa, supuestamente permitiendo visualizar el efecto del gen introducido (*iaaL*) sin la intervención de posibles factores debidos a diferencias entre las cepas. Sería necesario llevar a cabo experimentos adicionales, posiblemente incluyendo la transformación integrativa y su corroboración mediante análisis tipo Southern, para evaluar más completamente la utilidad de las cepas solopatógenicas utilizadas en este trabajo, o de otras disponibles adicionalmente, en el estudio del efecto del gen *iaaL* sobre la producción *in vitro* de AIA y la patogenicidad de *U. maydis*.

## VII. CONCLUSIONES

La mayoría de las cepas de *Ustilago maydis* produjeron ácido indol-3-acético (AIA) *in vitro* alcanzando los niveles máximos durante la fase estacionaria de crecimiento; por lo general dichos niveles disminuyeron considerablemente después del máximo, siendo el hongo el responsable de dicha disminución.

Se logró el aislamiento de tres cepas mutantes de *Ustilago maydis* que presentaron una producción *in vitro* de ácido indol-3-acético (AIA) nula o disminuida en comparación con la producción mostrada por las cepas silvestres que les dieron origen. Las tres cepas resultaron ser auxotróficas, siendo incapaces total o parcialmente de crecer en medio mínimo.

La mutagénesis con ácido clofibrico resultó ser una técnica útil para el aislamiento de mutantes de *U. maydis* con producción disminuida de AIA.

Se obtuvieron cepas progenie mutantes AIA<sup>-</sup> resultantes de la cruce de la cepa mutante nula AIA<sup>-</sup> *udi1* con una cepa silvestre AIA<sup>+</sup>. El análisis de dicha progenie reveló que la mutante *udi1* posee una auxotrofia para metionina ligada a la mutación AIA<sup>-</sup>. La auxotrofia segregó de tal manera que sugiere que hay más de un locus involucrado en ella. El análisis de la progenie indicó que fue posible separar la auxotrofia para metionina, habiéndose obtenido cepas AIA<sup>-</sup> prototróficas. Además, este análisis sugiere una localización tentativa de la mutación AIA<sup>-</sup>, en mapas previamente reportados, en el mismo grupo de ligamiento o cromosoma electroforético en el que se encuentra el locus *b*.

Los resultados de infectividad en plantas de maíz sugieren que el o los genes afectados en las mutantes AIA<sup>-</sup> obtenidas tienen que ver con la patogenicidad del hongo. En particular, apoyan la hipótesis de que las cepas de *Ustilago maydis* requieren de la capacidad de producir AIA para poder ser infectivas e inducir tumores en el huésped.

Las cepas haploides de *U. maydis* mostraron mayor infectividad en plántulas de maíz que las cepas solopatogénicas. Los niveles de producción de AIA *in vitro* y la infectividad de *Ustilago maydis* en plantas, indican que una alta producción de AIA *in vitro* no asegura que las cepas desarrollen una alta

infectividad. Esto confirma la existencia de factores adicionales que determinan la patogenicidad, los cuales parecen ser dominantes sobre el carácter de producción de AIA. Sin embargo, todas las cepas que desarrollaron alta infectividad produjeron AIA en niveles relativamente altos, lo que apoya la hipótesis de que el AIA juega un papel importante en el desarrollo de la infección.

Se construyeron cepas transformadas de *Ustilago maydis* con el gen bacteriano *iaaL*, las cuales permitieron evaluar el efecto de dicho gen sobre la producción *in vitro* de AIA por las cepas, en relación a cepas testigo. Se logró disminuir la concentración de AIA libre producido *in vitro* por cepas de *U. maydis* transformadas con el gen *iaaL*. Estas cepas mostraron una disminución de la capacidad de infección en plántulas de maíz. El vector de expresión de *Ustilago* pUBLEX1, con promotor inducible por choque térmico *hsp70*, mostró los mejores resultados en cuanto a la disminución del AIA producido *in vitro* y a la reducción de la infectividad de las cepas transformadas en plántulas de maíz en pruebas de invernadero.

La disminución de la infectividad de las cepas transformadas, con respecto a las cepas sin transformar y transformadas con el gen *iaaL* en orientación invertida, apoya la hipótesis de que el AIA producido por *Ustilago maydis* juega un papel importante en la capacidad del hongo de desarrollar los tumores en la infección.

En general, los resultados obtenidos muestran que la capacidad de *Ustilago maydis* de inducir la formación de tumores en plantas de maíz es indicativa de la capacidad del hongo de producir AIA *in vitro*; lo contrario no necesariamente es aplicable en vista de que existen factores de patogenicidad dominantes. Asimismo, sugieren que la capacidad del hongo de producir AIA, aparentemente sin intervención de la capacidad de la planta, es la que participa en la formación de los tumores.

## VIII. PERSPECTIVAS

La información generada en el presente trabajo representa una contribución significativa al conocimiento de los mecanismos moleculares de fitopatogenicidad en interacciones planta-hongo.

El trabajo aportó elementos, tales como cepas mutantes y transformadas, que podrán ser utilizadas para contribuir al esclarecimiento de la ruta biosintética del ácido indol-3-acético en *Ustilago maydis*.

El presente trabajo da la pauta para realizar estudios posteriores tendientes principalmente a la limpieza de los fondos genéticos de las cepas mutantes y a la determinación de grupos de complementación entre ellas. Asimismo, sería necesario llevar a cabo el análisis estadístico detallado de las mutaciones y la progenie con fines de mapeo. La complementación de las mutantes mediante transformación con una biblioteca genómica conduciría a la clonación y caracterización de los genes de biosíntesis de AIA por este hongo. Además, la transformación integrativa de cepas casi isogénicas de *U. maydis* con el gen *iaaL* serviría, entre otros fines, para corroborar el efecto de dicho gen sobre la producción *in vitro* de AIA y fundamentalmente sobre la patogenicidad del hongo.

La aplicación del conocimiento adquirido y las herramientas desarrolladas, eventualmente permitiría proponer nuevas estrategias para el control de una serie de importantes enfermedades fúngicas de plantas. Además, tal aplicación permitiría desarrollar nuevas tecnologías para la producción comercial de huitlacoche, un ancestral hongo comestible que ha encontrado, especialmente en algunos mercados internacionales, una aceptación cada día mayor y una demanda hasta ahora insatisfecha.

## LITERATURA CITADA

- Alexander, K. C., y P. Padmanaban. 1992. Smut of sugarcane. En: A. N. Mukhopadhyay, J. Kumar, U.S. Singh, y H.S. Chaube (Ed.). Plant Diseases of International Importance, Vol. IV: Diseases of Sugar, Forest and Plantation Crops, Cap 2, p 16. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Alexopoulos, C. J., y C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology (3a. Ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Arshad, M., y W. T. Frankenberger Jr. 1991. Microbial production of plant hormones. Plant and Soil 133:1-8.
- Baldi, B. G., B. R. Maher, J. P. Slovin, y J. D. Cohen. 1991. Stable isotope labelling *in vivo* of D-and L-tryptophan pools in *Lemna gibba* and low incorporation of label into indole-3-acetic acid. Plant Physiology 95:1203-1210.
- Bandurski, R. S., J. D. Cohen, J. Slovin, y D. M. Reinecke. 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. En: P. J. Davies (Ed.). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. p 39. Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA.
- Banuett, F. 1992. *Ustilago maydis*, the delightful blight. Trends in Genetics 8:174-180.
- Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annual Review of Genetics 29:179-208.
- Banuett, F., y I. Herskowitz. 1988. *Ustilago maydis*, smut of maize. Advances in Plant Pathology 6:427-455.
- Banuett, F., y I. Herskowitz. 1989. Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86:5878-5882.
- Banuett, F., y I. Herskowitz. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122:2965-2976
- Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli, y G. Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiological Letters 36:87-90.

- Barrett, K. J., S. E. Gold, y J. W. Kronstad. 1993. Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:274-283.
- Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 48:51-66.
- Bartel, B., y G. R. Fink. 1994. Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:6649-6653.
- Bartling, D., M. Seedorf, R. C. Schmidt, y E. W. Weiler. 1994. Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: Key enzymes in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:6021-6025.
- Basse, C. W., F. Lottspeich, W. Steglich, y R. Kahmann. 1996. Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry* 242:648-656.
- Basse, C. W., y R. Kahmann. 1994. Phytohormone biosynthesis in *Ustilago maydis*. En: Abstracts of the Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Abstr 415) June 26-July 1st, 1994, University of Edinburgh, International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, Edinburgh, Scotland.
- Bialek, K., W. Meudt, y J. Cohen. 1983. Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections. *Plant Physiology* 73:130-134.
- Boerjan, W., C. Genetello, M. Van Montagu, y D. Inzé. 1992. A new bioassay for auxins and cytokinins. *Plant Physiology* 99:1090-1098.
- Bölker, M., M. Urban, y R. Kahmann. 1992. The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68:441-450.
- Brandl, M., E. M. Clark, y S. E. Lindow. 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4121-4128.
- Budar, F., F. Deboeck, M. Van Montagu, y J. P. Hermaalsteens. 1986. Introduction and expression of the octopine T-DNA oncogenes in tobacco plants and their progeny. *Plant Science* 46:195-206.
- Callow, J. A., y I. T. Ling. 1973. Histology of neoplasms and chlorotic lesions in maize seedlings following the injection of sporidia of *Ustilago maydis* (DC)

Corda. *Physiological Plant Pathology* 3:489-494.

- Camilleri, C., y L. Jouanin. 1991. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of *A. rhizogenes* agropine type plasmid pRiA4: Nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:155-162.
- Chao-Shieung F., R. Hamilton, y R. Muma. 1977. Metabolism of indole-3-acetic acid. *Plant Physiology* 59:91-93.
- Chkanikov, D. I., E. N. Artemenko, y S. G. Grinchenko. 1990. Role of indole-3-acetic acid in pathogenesis of wheat stem rust and brown rust. *Soviet Plant Physiology* 37:451-454.
- Christensen, J. J. 1963. Corn smut caused by *U. maydis*. Monograph No. 2. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Clark, E., S. Manulis, Y. Ophir, I. Barah, y Y. Gafni. 1993. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophillae*. *Phytopathology* 83:234-240.
- Cohen, J. D. 1983. Metabolism of indole-3-acetic acid. What's New in Plant Physiology 14:41-44.
- Cohen, J. D., y R. Bandurski. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33:403-430.
- Comai, L., y T. Kosuge. 1983. The genetics of indoleacetic acid production and virulence in *Pseudomonas savastanoi*. En: A. Puhler (Ed.). *Molecular Genetics of the Bacteria Plant Interaction*. p 362. Springer-Verlag, Berlin.
- Cooney, T. P., y H. M. Nonhebel. 1991. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: Measurement, mass spectral identification and incorporation of  $^2\text{H}$  from  $^2\text{H}_2\text{O}$  into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 184:368-376.
- Costacurta, A., V. Keijers, y J. Vanderleyden. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indol-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics* 243:463-472.
- Costacurta, A., y J. Vanderleyden. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Review of Microbiology* 21:1-18.
- Crozier, A., P. Arruda, J. M. Jazmín, A. M. Monteiro, y G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum*

*lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology 54:2833-2837.

- Danneberg, G., C. Latus, W. Zimmer, B. Hundeshagen, H. J. Schneider-Poetsch, y H. Bothe. 1992. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Physiology 141:33-39.
- Davies, P. J. 1995. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. En: P. J. Davies (Ed.). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. p 1. Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA.
- Day, P. R., y S. L. Anagnostakis. 1971. Corn smut dikaryon in culture. Nature New Biology 231:19-20.
- Dixon, G. R. 1984. Galls caused by fungi and bacteria. En: R. K. S. Wood y G.J. Jellis (Ed.). Plant Diseases: Infection, Damage and Loss. Cap 15, p 189. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Durand, N., J. C. Debaud, L. A. Casselton, y G. Gay. 1992. Isolation and preliminary characterization of 5-fluoroindole-resistant and IAA-overproducer mutants of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. New Phytologist 121:545-553.
- Ehmann, A. 1977. The van Urk-Salkowski reagent - A sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. Journal of Chromatography 132:267-276.
- Ek, M., P. O. Ljungquist, y E. Stenström. 1983. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. New Phytologist 94: 401-407.
- Ernstsen, A., G. Sanberg, A. Crozier, y C. T. Wheeler. 1987. Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. Planta 171:422-428.
- Fet, W. F., S. F. Osman, y M. F. Dunn. 1987. Auxin production by plant-pathogenic Pseudomonads and Xantomonads. Applied and Environmental Microbiology 53:1839-1845.
- Follin, A., D. Inzé, F. Budar, C. Genetello, M. Van Montagu, y J. Schell. 1985. Genetic evidence that the tryptophan 2-mono-oxygenase gene of *Pseudomonas savastanoi* is functionally equivalent to one of the T-DNA genes involved in plant tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular and General Genetics 201:178-185.

- Fukuhara, H., Y. Minakawa, S. Akao, y K. Minasawa. 1994. The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant and Cell Physiology* 35:1261-1265. .
- Furukawa, T., J. Koga, T. Adachi, K. Kishi, y K. Syono. 1996. Efficient conversion of L-tryptophan to indole-3-acetic acid and/or tryptophol by some species of *Rhizoctonia*. *Plant and Cell Physiology* 37:899-905.
- Gaudin, V., V. Thierry y L. Jouanin. 1994. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 32:11-29.
- Gay, G. 1990. Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in de-rooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Canadian Journal of Botany* 68:1265-1270.
- Gillissen, B., J. Bergemann, C. Sandmann, B. Schroeer, M. Bölker, y R. Kahmann. 1992. A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* 68:647-657.
- Glass N. L., y T. Kosuge. 1988. Role of indoleacetic acid-lysine synthase in regulation of indoleacetic acid pool size and virulence of *Pseudomonas syringae* subs. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology* 170:2367-2373.
- Glickmann, E., y Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61:793-796.
- Gold, S. E., G. Bakkeren, J. E. Davies, y J. W. Kronstad. 1994. Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* 142:225-230.
- Gordon, S. A., y R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.
- Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmasov, y J. Murfett. 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiology* 118:341-347.
- Gyulai, G., J. Kiss, Z. Jekkel, E. Kiss, y L. E. Heszky. 1995. A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 145:379-382.
- Hangarter, R. P., y N. E. Good. 1981. Evidence that IAA conjugates are slow-release sources of free IAA in plant tissues. *Plant Physiology* 68:1424-1427.
- Hartmann, A., M. Singh, y W. Klingmuller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian*

Journal of Microbiology 29:916-923.

- Hirano, T., y M. Yanagida. 1989. Controlling elements in the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. En: E. F. Walton y G. T. Yarranton (Ed.). Molecular and Cell Biology of Yeasts. Cap 7, p 223. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Holden, W. D., J. W. Kronstad, y S. A. Leong. 1989. Mutation in a heat-regulated *hsp70* gene of *Ustilago maydis*. The EMBO Journal 8:1927-1934.
- Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. En R. C. King (Ed.). Handbook of Genetics. Vol 1, p 575. Plenum Press, New York.
- Holliday, R. 1961. The genetics of *Ustilago maydis*. Genetic Research 2:204-230.
- Hunter, W. J. 1989. Indole-3-acetic acid production by bacteroids from soybean root nodules. Physiologia Plantarum 76:31-36.
- Jensen, P. J., y R. S. Bandurski. 1994. Metabolism and synthesis of indole-3-acetic acid (IAA) in *Zea mays*. Plant Physiology 106:343-351.
- Kinal, H., J. Tao, y J. A. Bruenn. 1991. An expression vector for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Gene 98:129-134.
- Kinscherf, T. G., y S. A. Leong. 1988. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. Chromosoma (Berl) 96:427-433.
- Kleczkowski, K., y J. Schell. 1995. Phytohormone conjugates: Nature and function. Critical Reviews in Plant Science 14:283-298.
- Klee, H. J., R. B. Horsch, M. A. Hinchey, M. B. Hein, y N. L. Hoffmann. 1987. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. Genes & Development 1:86-96.
- Kmiec, E. B., y W. K. Holloman. 1986. Homologous pairing of DNA molecules by *Ustilago* Rec1 protein is promoted by sequences of Z-DNA. Cell 44:545-554.
- Kobayashi, M., H. Izui, T. Nagasawa, y H. Yamada. 1993. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 90:247-251.
- Koga, J., T. Adachi, y H. Hidaka. 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. Molecular and

General Genetics 226:10-16.

- Koltin, Y. 1988. The killer system of *Ustilago maydis*: Secreted polypeptides encoded by viruses. En: Y. Koltin y M. J. Leibowitz (Ed.). Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes. p 209. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Koshiha, T., y H. Matsuyama. 1993. An *in vitro* system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. Plant Physiology 102:1319-1324.
- Kosuge, T., L. Comai, y N. L. Glass. 1983. Virulence determinants in plant-pathogen interactions. En: R. B. Goldberg (Ed.). Plant Molecular Biology. p 167. Proceedings of the ARCO Solar-UCLA Symposium, April 16-22, Keystone, CO. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Kronstad, J. W. 1995. Mating-type and fungal pathogenesis. En: K. Kohmoto, U. S. Singh, y R. P. Singh (Ed.). Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Vol II: Eukaryotes. Cap 1, p 1. Pergamon/Elsevier Science Ltd., Oxford.
- Kronstad, J. W., J. Wang, S. F. Covert, D. W. Holden, G. L. McKnight, y S. A. Leong. 1989. Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Gene 79:97-106.
- Kronstad, J. W., y S. A. Leong. 1989. Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86:978-982.
- Kuo, T. T., y Kosuge, T. 1969. Factors influencing the production and further metabolism of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas savastanoi*. Journal of General and Applied Microbiology 15:51-63.
- Leong, S. A., J. Wang, A. Budde, D. Holden, T. Kinscherf, y T. Smith. 1987. Molecular strategies for the analysis of the interaction of *Ustilago maydis* and maize. En: C. Arntzen, y C. Ryan (Ed.). Molecular Strategies for Crop Protection. p 95. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Liu, S. T., K. L. Perry, C. L. Schardl, y C. I. Kado. 1982. *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 78:2812-2816.
- Loper, J. E. y M. N. Schroth. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology 76:386-389.
- Ludwig-Müller, J., U. Bendel, P. Thermann, M. Ruppel, E. Epstein, y W. Hilgenberg.

1993. Concentrations of indole-3-acetic acid in plants of tolerant and susceptible varieties of Chinese cabbage infected with *Plasmodiophora brassicae* Woron. *New Phytologist* 125:763-769.
- Ludwig-Müller, J., y W. Hilgenberg. 1990. Identification of indole-3-acetaldehyde and indole-3-acetaldehyde reductase in Chinese cabbage. *Physiologia Plantarum* 80:541-548.
- Manulis, S., L. Valinski, Y. Gafni, y J. Hershenhorn. 1991. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in *Erwinia herbicola* in relation to pathogenicity on *Gypsophila paniculata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:161-171.
- Martínez V. M., J. Osuna, O. Paredes-López, y F. Guevara. 1997. Production of indole-3-acetic acid by several wild-type strains of *Ustilago maydis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13:295-298.
- Mazzola, M., y F. F. White. 1994. A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production. *Journal of Bacteriology* 176:1374-1382.
- McDougall, J., y J. R. Hillman. 1978. Analysis of indole-3-acetic acid using GC-MS techniques. En: J. R. Hillman (Ed.). *Isolation of Plant Growth Substances*. p 1. Cambridge University Press, Cambridge.
- Minamisawa, K., K.-I. Ogawa, H. Fukuhara, y J. Koga. 1996. Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. *Plant and Cell Physiology* 37:449-453.
- Moore-Landecker, E. 1982. *Fundamentals of the Fungi* (2nd Ed.). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Moore, T. C. 1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag, New York.
- Moulton, J. E. 1942. Extraction of auxin from maize, from smut tumors of maize and from *Ustilago zaeae*. *Botanical Gazette* 103:725-739.
- Mousedale, D. M. A., D. N. Butcher, y R. G. Powell. 1978. Spectrofluorimetric methods of determining indole-3-acetic acid. En: J. R. Hillman (Ed.). *Isolation of Plant Growth Substances*. p 27. Cambridge University Press, Cambridge.
- Navarre, D. A. 1990. Phytohormone production, auxin biosynthesis and electrophoretic karyotypes for *Ustilago maydis* and other smuts. M.Sc. Thesis.

Louisiana State University, Baton Rouge.

- Navarre, D. A., y K. E. Damann. 1990. Synthesis of indole-3-acetic acid by *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 80:1055 (Abstr A784).
- Nonhebel, H. M., T. P. Cooney, y R. Simpson. 1993. The route, control and compartmentation of auxin synthesis. *Australian Journal of Plant Physiology* 20:527-539.
- Normanly, J., J. D. Cohen, y G. R. Fink. 1993. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90:10355-10359.
- Normanly, J., J. P. Slovin, y J. D. Cohen. 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiology* 107:323-329.
- Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, y J. K. Uyemoto. 1995. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Olivárez-Sáenz, E. 1994. Paquete de Diseños Experimentales FAUANL (Versión 2.5). Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Marín, N.L.
- Omay, S. H., W. A. Schmidt, y P. Martin. 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 39:187-192.
- Patten, C. L., y B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42:207-220.
- Perley, J. E. y B. B. Stowe. 1996. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. *Plant Physiology* 41:234-237.
- Prikryl, Z., V. Vancura, y M. Wurst. 1985. Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. *Biologia Plantarum* 27:159-163.
- Prinsen, E., A. Costacurta, K. Michiels, J. Vanderleyden, y H. Van Onckelen. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: Evidence for a non tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:609-615.
- Prinsen, E., N. Chauvanux, J. Schmidt, M. John, U. Wieneke, J. De Greef, J. Schell, y H. Van Onckelen. 1991. Stimulation of indole-3-acetic acid production

in *Rhizobium* by flavonoids. FEBS Letters 282:53-55.

- Rajagopal, R., K. Tsurusaki, G. Kannangara, S. Kuraishi, y N. Sakurai. 1994. Natural occurrence of indoleacetamide and amidohydrolase activity in etiolated aseptically-grown squash seedlings. *Plant and Cell Physiology* 35:329-339.
- Rausch, T., D. N. Butcher, y W. Hilgenberg. 1983. Indol-3-methylglucosinolate biosynthesis and metabolism in clubroot diseased plants. *Physiologia Plantarum* 58:93-100.
- Rekoslavskaya, N. I., y R. S. Bandurski. 1994. Indole as precursor of indole-3-acetic acid in *Zea mays*. *Phytochemistry* 35:905-909.
- Richard, G., J. Bailey, J. Keon, y J. Hargeaves. 1992. Development of a GUS reporter gene system for the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40:383-393.
- Roberto, F., H. Klee, F. White, R. Nordeen, y T. Kosuge. 1990. Expression and fine structure of the gene encoding N( $\epsilon$ -(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87:5797-5801.
- Roberto, F., y T. Kosuge. 1987. Phytohormone metabolism in *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. En: E. W. Fox, y M. Jacobs (Ed.). *Molecular Biology of Plant Growth Control*. p 371. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Romano, C. P., M. B. Hein, y H. J. Klee. 1991. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes & Development* 5:438-446.
- Romano, C. P., P. R. H. Robson, H. Smith, M. Estelle, y H. Klee. 1995. Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: Hypocotyl elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. *Plant Molecular Biology* 27:1071-1083.
- Ruíz-Herrera, J., C. G. León, L. Guevara-Olvera, y A. Cárabez-Trejo. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141: 695-703.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Schneider, E. A., y F. Wightman. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 25:487-513.

- Schröder, J. 1987. Plant hormones in plant-microbe interactions. En: T. Kosuge, y E.W. Nester (Ed.). *Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives*. Vol 2, Cap 2, p 40. Macmillan Publishing Company, New York.
- Schulz, B., F. Banuett, M. Dahl, R. Schlesinger, W. Schäfer, T. Martin, I. Herskowitz, y R. Kahmann. 1990. The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60:295-306.
- Sembdner, G., D. Gross, H. W. Liebsch, y G. Schneider. 1981. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. En: J. MacMillan (Ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol 9, p 281. Springer-Verlag, New York.
- Sitbon, F., B. Sundberg, O. Olsson, y G. Sandberg. 1991. Free and conjugated IAA contents in transgenic tobacco plants expressing the *iaaM* and *iaaH* IAA biosynthesis genes from *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 95:480-485.
- Sitbon, F., C. H. Anthony Little, O. Olsson, y G. Sandberg. 1992a. Correlation between the expression of T-DNA IAA biosynthetic genes from developmentally regulated promoters and the distribution of IAA in different organs of transgenic tobacco. *Physiologia Plantarum* 85:679-688.
- Sitbon, F., S. Hennion, B. Sundberg, C. H. Anthony Little, O. Olsson, y G. Sandberg. 1992b. Transgenic tobacco plants coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens iaaM* and *iaaH* genes displayed altered growth and indoleacetic acid metabolism. *Plant Physiology* 99:1062-1069.
- Sosa-Morales, M. E., F. Guevara-Lara, V. M. Martínez-Juárez, y O. Paredes-López. 1997. Production of indole-3-acetic acid by mutant strains of *Ustilago maydis* (maize smut/huitlacoche). *Applied Microbiology and Biotechnology* 48:726-729.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.
- Spena, A., E. Prinsen, M. Fladung, S. C. Schulze, y H. Van Onckelen. 1991. The indoleacetic acid-lysine synthase gene of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* induces developmental alterations in transgenic tobacco and potato plants. *Molecular and General Genetics* 227:205-212.
- Surico, G., N. S. Iacobellis, y A. Sisto. 1985. Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology* 26:309-320.

- Surico, G., y N. S. Iacobellis. 1992. Phytohormones and olive knot disease. En: D. P. S. Verma (Ed). *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. p 209. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sziráki, I., E. Balázs, y Z. Kiraly. 1975. Increased levels of cytokinin and indoleacetic acid in peach leaves infected with *Taphrina deformans*. *Physiological Plant Pathology* 5:45-50.
- Thimann, K. V. 1935. On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. *Journal of Biological Chemistry* 109:279-291.
- Tomita, K., T. Kitsuwa, T. Murayama, y T. Nakamura. 1987. Identification of indole-3-acetic acid in *Neurospora crassa*. *Agricultural and Biological Chemistry* 51:2633-2634.
- Tsukuda, T., S. Carleton, S. Fotheringham, y W. K. Holloman. 1988. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and Cellular Biology* 8:3703-3709.
- Turian, G., y R. H. Hamilton. 1960. Chemical detection of 3-indolylacetic acid in *Ustilago zaeae* tumors. *Biochimica et Biophysica Acta* 41:148-150.
- Unrau, P., y R. Holliday. 1970. A search for temperature-sensitive mutants of *Ustilago maydis* blocked in DNA synthesis. *Genetic Research (Camb.)* 15:157-169.
- Valverde González, M. E. 1992. Estudios sobre la infección de *Ustilago maydis* (huitlacoche) y sus características alimentarias. Tesis de Maestría en Ciencias. Unidad Irapuato, CINESTAV-IPN. Irapuato, Gto., México.
- Valverde, M. E., P. Fallah Moghaddam, M. S. Zavala-Gallardo, J. K. Pataky, O. Paredes-López, y W. L. Pedersen. 1993. Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated with *Ustilago maydis* (DC) Corda. *HortScience* 28:782-785.
- Valverde, M. E., O. Paredes-López, J. K. Pataky, y F. Guevara-Lara. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source - Biology, composition and production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35:191-229.
- Valverde, M. E., y O. Paredes-López. 1993. Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Biotechnology* 7:207-219.
- Vanegas Espinoza, 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 de Maestría en Ciencias. Unidad Irapuato, CINVESTAV-IPN. Irapuato, Gto., México.

- Vanegas, P. E., M. E. Valverde, O. Paredes-López, y J. K. Pataky. 1995. Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on chemical composition. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80:11-14.
- Wang, J., D. W. Holden, y S. A. Leong. 1988. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus, *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85:865-869.
- Wareing, P. F., y I. D. J. Phillips. 1981. *Growth and Differentiation in Plants* (3rd Ed.). Pergamon Press, Oxford.
- Wolf, F. T. 1952. The production of indoleacetic acid by *Ustilago zaeae* and its possible significance in tumor formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 38:106-111.
- Wright, A. D., M. B. Sampson, M. G. Neuffer, L. Michalczyk, J. P. Slovin, y J. D. Cohen. 1991. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange pericarp*, a tryptophan auxotroph. *Science* 254:998-1000.
- Yamada, T. 1993. The role of auxin in plant-disease development. *Annual Review of Phytopathology* 31:253-273.
- Yamada, T., H. Tsukamoto, T. Shiraishi, T. Nomura, y H. Oku. 1990a. Detection of indoleacetic acid biosynthesis in some species of *Taphrina* causing hyperplastic diseases in plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56:532-540.
- Yamada, T., H. Tsukamoto, T. Shiraishi, S. Kawamata, y H. Oku. 1990b. Changes in indoleacetic acid production and chromosome length polymorphism in clofibric acid resistant mutants of *Taphrina wiesneri* and *Taphrina deformans*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56:651-657.
- Yamada, T., T. Nishino, T. Shiraishi, T. Gaffney, F. Roberto, C. J. Palm, H. Oku, y T. Kosuge. 1991. The role of indoleacetic acid biosynthetic genes in tumorigenicity. En: S. S. Patil, S. Ouchi, D. Mills, y C. Vance (Ed.). *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*. Cap 7, p 83. Springer-Verlag, New York.
- Yee, A. R., y J. W. Kronstad. 1993. Construction of chimeric alleles with altered specificity at the *b* incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the USA 90:664-668.

Zimmer, W., K. Roeben, y G. H. Bothe. 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta* 176:333-342.

## APÉNDICE - SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\alpha$	nivel de significancia
%	por ciento
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrómetro(s)
$^{\circ}\text{C}$	grado(s) centígrado(s)
001	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
002	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
031	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
032	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
ACF	ácido clofíbrico
AIA	ácido indol-3-acético
AIA <sup>-</sup>	fenotipo de producción <i>in vitro</i> nula o disminuida de AIA
AIA <sup>+</sup>	fenotipo de producción <i>in vitro</i> silvestre de AIA
AIA <sup>++</sup>	fenotipo de producción <i>in vitro</i> exagerada de AIA
AIL	ácido indol-3-láctico
AIPIr	ácido indol-3-pirúvico
Amp	ampicilina
BamHI	enzima de restricción BamHI
BglII	enzima de restricción BglII
Bx711	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
Bx722	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
cm	centímetro(s)
col.	colaboradores
cpm	cuentas por minuto
CT	choque térmico
D12	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
d132	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
EcoRV	enzima de restricción EcoRV
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
etc.	etcétera
FB1	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
FB2	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
g	gramo(s)
gap	gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	cromatografía de gases
GW	reactivo de Salkowski según Gordon y Weber
h	hora(s)
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
<i>hsp70</i>	gen de la proteína de choque térmico de 70 kDa
<i>iaaL</i>	gen de la indol-3-acetil-lisina sintetasa

IAAId	indol-3-acetaldehído
IAldox	indol-3-acetaldoxima
Iam	indol-3-acetamida
IAN	indol-3-acetonitrilo
IEtOH	indol-3-etanol (triptofol)
kDa	kilodaltones
kg	kilogramo(s)
kpb	kilo pares de bases
L	litro(s)
LB	medio Luria-Bertani
log <sub>10</sub>	logaritmo base 10
M	molar
mμ	milimicra(s)
MDC-S	medio doble completo de Holliday con sorbitol
Met	Metionina
Met <sup>-</sup>	fenotipo de auxotrofia para metionina
Met <sup>+</sup>	fenotipo de prototrofia para metionina
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mm	milímetro(s)
MS	espectrometría de masas
N.D.	no determinado
ng	nanogramo(s)
nm	nanómetro(s)
p	página(s)
p/p	peso en peso
p/v	peso en volumen
P1	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
P2	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
P6D	Cepa de <i>U. maydis</i> , ver Cuadro 2
pb	pares de bases
PC	reactivo de Salkowski según Pilet y Chollet
PDA	agar papa-dextrosa
PDB	caldo papa-dextrosa
PEG	polietilenglicol
Phleo	marcador de resistencia a antibióticos de la familia de la bleomicina (fleomicina y zeocina)
pHy	vector pUXV10 sin inserto, ver Cuadros 3 y 4
pHyLc	vector pUXV10 con inserto <i>iaaL</i> en orientación correcta, ver Cuadros 3 y 4
pHyLi	vector pUXV10 con inserto <i>iaaL</i> en orientación invertida, ver Cuadros 3 y 4
pMON690	plásmido que contiene al gen <i>iaaL</i> , ver Figura 7