

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS ASOCIADAS AL HUITLACOCHÉ

E. Guevara-Vázquez¹; E. Valadez-Moctezuma^{2¶};
M. Acosta-Ramos¹; T. Espinosa-Solares³;
C. Villanueva-Verduzco⁴

¹Departamento de Parasitología Agrícola.

²Departamento de Fitotecnia.

³Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.
Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. MÉXICO.
Correo-e: evaladez@correo.chapingo.mx) ([¶]Autor responsable)

RESUMEN

Ustilago maydis (D. C.) Corda es el hongo fitopatogénico que produce el "huitlacoche" en las mazorcas de maíz. Su producción es de marcado interés comercial; pero su rendimiento y calidad pueden verse afectados debido a la presencia antagonista de levaduras asociadas a la agalla. Dependiendo del grado de infección en estas estructuras puede existir mayor contenido de mezcla de levaduras que de *U. maydis*, lo que puede ser una de las causas de la baja infestación en campo. Los objetivos del trabajo fueron diagnosticar la presencia de levaduras en aislamientos integrantes de un cepario de *U. maydis* y en agallas frescas de huitlacoche y tratar de explicar su asociación. Para diferenciar los dos tipos de microorganismos, se empleó la prueba de ureasa y la identidad fue corroborada por técnicas moleculares y secuenciación de ITS de las levaduras. Los resultados indicaron que éstas pertenecen a las especies *Candida railenensis*, *C. quercitrusa* y *Pichia guilliermondii* y fueron capaces de inhibir el crecimiento de *U. maydis* en condiciones de laboratorio.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Ustilago maydis*, PCR, levaduras antagonistas, *Candida railenensis*, *Candida quercitrusa*, *Pichia guilliermondii*.

IDENTIFICATION OF YEASTS ASSOCIATED WITH HUITLACOCHÉ

ABSTRACT

Ustilago maydis (DC) Corda is the phytopathogenic fungus that produces "huitlacoche" on the ears of corn. Its production is of high commercial interest, but yield and quality can be affected by the presence of antagonistic yeasts associated with the gall. Depending on the degree of infection, the galls may have a higher content of yeasts than of *U. maydis*, which may be a cause of low infestation in the field. The goals of this study were to determine the presence of yeast isolates in a collection of *U. maydis* and from fresh huitlacoche gall and to explain the association in this structure. To differentiate the two types of microorganisms, the urease test was used and identity was confirmed by molecular techniques and ITS sequencing of the yeast. The results indicated that the yeasts belong to the species *Candida railenensis*, *C. quercitrusa* and *Pichia guilliermondii* and were able to inhibit the growth of *U. maydis* under laboratory conditions.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Ustilago maydis*, PCR, antagonistic yeast, *Candida railenensis*, *Candida quercitrusa*, *Pichia guilliermondii*.

INTRODUCCIÓN

Ustilago maydis (*U. maydis*) es el agente causal del carbón común del maíz, que se conoce como "huitlacoche". Este producto es un alimento tradicional en México donde se consume como un platillo exótico. A nivel nacional su producción se limita a la región central de México donde se comercializan de 400 a 500 toneladas por año (Villanueva,

1997; Pataky *et al.*, 1999); pero existe una demanda creciente para los mercados de U.S.A, Unión Europea y Japón, llegando a alcanzar precios superiores a los 20 dólares americanos por kilogramo. Se reconocen tres formas principales para la producción de huitlacoche: 1) Crecimiento natural espontáneo en las mazorcas de maíz; 2) producción mediante infección empírica y 3) producción con técnica de inoculación (Pataky, 1999). Este mismo autor señaló

que para la producción de huitlacoche se requiere de una técnica sencilla de inoculación, genotipos de maíz susceptibles y un método específico de cosecha, donde la producción de basidiosporas se lleva a cabo en medio de cultivo papa dextrosa agar, dando origen a colonias con un crecimiento tipo levadura de color crema claro amarillento, que cuando madura, cambia a una tonalidad marrón. Sin embargo, durante el aislamiento de las basidiosporas, pueden acarrear microorganismos contaminantes que se confunden fácilmente dada su morfología y comportamiento en el medio de cultivo y que están presentes en las agallas que fueron previamente desarrolladas por *U. maydis*. Particularmente en este tipo de asociaciones, se han reportado levaduras con actividad antagonista donde compiten con el patógeno por espacio y nutrientes ejerciendo parasitismo directo; estas levaduras son capaces de producir la enzima β -1,3-D-glucanasa que es capaz de degradar paredes celulares, (Vaccari, 2001; Mari y Guzzardi, 1998; Polonelli y Morace, 1986). Recientemente Chanchaichaovivat *et al.* (2007) reportaron que las levaduras *Pichia guilliermondii*, *Candida musae*, *Issatchenkia orientalis*, y *Candida quercitrusa* mostraron eficiencia para reducir la enfermedad causada en chile por *Colletotrichum capsici*. En particular, estos autores encontraron que *P. guilliermondii* es la levadura que más reduce la antracnosis de este fruto. Ese mismo grupo (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008) indicó que *P. guilliermondii* se fija al hongo *C. capsici*, lo que aparentemente restringe su proliferación en las heridas del chile. Cuando se cultivaron ambos microorganismos en el jugo del chile se observó que *P. guilliermondii* suprime la germinación de esporas y la longitud del tubo germinal de *C. capsici*; dicha supresión terminó con la adición de glucosa, sacarosa o nitrato, lo cual sugiere que la levadura compite con el hongo por dichos sustratos. Adicionalmente, *P. guilliermondii* produce enzimas hidrolíticas tanto en medio sólido como líquido, como β -1,3-glucanasa y quitinasa siendo éste otro mecanismo de acción en contra de *C. capsici*. También se reporta (Ízgü *et al.*, 2006) que *Pichia anómala* produce *exo*- β -1,3-glucanasa que inhibe una gran variedad de levaduras incluyendo la patógena *Candida* spp. La identificación de las levaduras se ha basado en la descripción morfológica y fisiológica, pero éstas dependen de las condiciones de cultivo de las cepas; las levaduras de ascomycetes son fácilmente confundibles con el desarrollo de basidiomicetes bajo estas condiciones, por lo que se suele incurrir en errores en la identificación de géneros y especies. Lo anterior se puede evitar rápidamente con la aplicación de pruebas bioquímicas tales como la de ureasa y su posterior corroboración con técnicas moleculares (Orberá, 2004). Con base en lo anterior, se realizó la presente investigación con el objetivo de diagnosticar la presencia de levaduras en aislamientos integrantes de un cepario de *U. maydis* y en agallas frescas de huitlacoche; así como su identificación molecular y tratar de buscar una posible explicación a la presencia de éstas y *U. maydis* en la agalla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio, se utilizaron veintiún aislamientos provenientes de una colección de *U. maydis* aislados de agallas en maíz (huitlacoche) y mantenidos en condiciones de laboratorio. Estos aislamientos habían sido caracterizados previamente con técnicas basadas en PCR (datos no mostrados) y cuyos perfiles de DNA indicaron amplias diferencias entre los organismos que se compararon en su momento, por lo que se dudaba de su origen. Los aislamientos se activaron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y cloranfenicol a una concentración de 500 ppm durante ocho días a 28 °C (Cuadro 1).

Evaluación fisiológica. Prueba de ureasa

Debido a que todas las cepas referidas presentaron colonias con crecimiento similar en el medio de cultivo sólido, se utilizó la prueba de la ureasa para discriminar organismos ascomycetes (levaduras) de basidiomicetes, clase a la que pertenece *U. maydis* (Deak y Beuchat, 1996).

CUADRO 1. Cepas utilizadas a partir de la colección obtenida de agallas de huitlacoche.

| Aisla- miento | Origen | Observación |
|------------------|---|--|
| 1 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 2 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 3 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 4 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 5 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 6 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 7 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 8 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 9 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 10 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 11 | Agalla colectada en campo | Inoculación sobre maíz H-135 |
| 12 | Colecta H-135, Cholula, Puebla | Colectada en 1998 |
| 13 | Descendencia de MH | |
| 14 | Colecta maíz negro, Chapingo, Méx | Colectada en 1998 |
| 15 | Descendencia de MN | |
| 16 | Mezcla de MH y MN | Colectada en 1998 |
| 17 | Descendencia MNH | |
| 18 | Mezcla de las cepas 26,28, , 42,65,70,71,73,80,81,89 | Colectada en 1998 |
| 19 | Descendencia de MZC | |
| 20 | Agalla colectada en campo | Inoculada sobre maíz 30G40 en el año 2006 |
| 21 | Agalla colectada en campo | Inoculada sobre maíz A-791* |
| 22 | Agalla comercial | Adquirida en mercado local (Texcoco)** |

*Cepa de *U. maydis* usada como control positivo, obtenida de la colección.

**Cepa aislada de agallas de huitlacoche fresco.

Esta discriminación se basa en que las levaduras de esa clase de ascomycetes no tienen actividad de ureasa (ureasa negativa), mientras que los basidiomycetes sí la presentan (ureasa positiva). Esta reacción se visualiza por un cambio de coloración de amarillo a color rojo magenta ocasionado por el incremento de alcalinidad en el medio (Schaad, *et al.*, 2001). Para la evaluación se preparó el reactivo correspondiente de acuerdo a Schaad *et al.* (2001) y se realizaron tres repeticiones independientes por cada aislamiento; los tubos contenían 5 mL de reactivo (color amarillo) y se inocularon con cada una de las 21 cepas (además de la aislada de huitlacoche fresco), después se colocaron en baño maría a 28 ± 2 °C por un periodo de cuatro horas, tiempo suficiente para observar el cambio de color.

Detección molecular de *U. maydis*

Con la finalidad de diferenciar aislamientos de *Ustilago maydis* de los microorganismos tipo levadura que se consideraron en el estudio, se obtuvo DNA de todos ellos de acuerdo al protocolo utilizado por Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente mediante PCR se amplificó un fragmento de DNA distintivo para este basidiomycete, utilizando el par de iniciadores 5'- GAA CCT TTC TGG CCT CCT TT- 3' y 5'- CCT TGG TTT CCG TTC CGT AC- 3' reportado por Xu *et al.* (1999), así como las condiciones de reacción indicadas por ellos. Con fines de comparación se utilizó el Marcador de Peso Molecular de 1 kb de Fermentas.

Identificación molecular de *U. maydis* y microorganismos tipo levadura asociados a las agallas de huitlacoche

Para la identificación de los diferentes aislamientos de microorganismos asociados a las agallas de huitlacoche, se amplificó con PCR la región de los "Internal Transcribed Spacer" (ITS) utilizando los iniciadores ITS5 (forward) y el iniciador ITS4 (reverse), que reconocen el extremo final del gen 18S y el inicio (pero en sentido inverso) del gen 28S del DNA ribosomal. El programa de termociclaje utilizado fue: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C, 4 minutos, 35 ciclos [95 °C, 1 minuto; 55 °C, 1 minuto; 72 °C, 2 minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa 1 %. Posteriormente, los fragmentos para secuenciación se limpiaron con el kit de PCR QIACLEAN marca QIAGEN siguiendo los pasos del fabricante y se secuenciaron con un Analizador Genético 3130 de Applied Biosystems. Las secuencias se editaron con ayuda de los softwares Finch TV y BioEdit y se compararon con la información de la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Evaluación del efecto antagonista de levadura sobre *U. maydis*

Debido a que todos los aislamientos considerados en el estudio resultaron ser ureasa negativa a excepción del

aislamiento 21 (cepa M3 A-791) que se identificó cultural y bioquímicamente como *U. maydis*, además de que fue el único que presentó el fragmento esperado de DNA de 900 pb; se procedió a buscar una explicación a la presencia y relación de los microorganismos tipo levadura asociados al huitlacoche tanto en agallas frescas (obtenidas del mercado local), como en los aislamientos conservados en el cepario. Para esto, se procedió a estriar la cepa M3 A-791 en el centro de 20 cajas petri con medio de cultivo PDA y cloranfenicol (500 ppm), diez de ellas se estriaron en la periferia con la cepa 81 y las otras diez con la cepa 71 (ambos aislamientos de levaduras según la prueba de ureasa y PCR) cuidando de no sobreponer el aislamiento sobre *U. maydis* (cepa M3 A-791). Las cajas se incubaron a 25 °C durante ocho días, después de las cuales se evaluó visualmente el crecimiento simultáneo de ambos microorganismos considerando el efecto inhibitorio o invasivo de las levaduras hacia *U. maydis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del crecimiento en medio de cultivo sólido de las cepas y prueba de ureasa

Como resultado de la siembra de los aislamientos en medio PDA, se observó que prácticamente todos formaron colonias tipo levadura con morfología similar, de color claro cremoso, mate y cóncavas de consistencia mucosa. Estas características contrastaron con las observadas en el aislamiento de la cepa M3 A-791 (identificado molecularmente como *Ustilago maydis*), ya que este último adquirió un color marrón después del lapso de ocho días en el medio de cultivo (Kronstad y Leong, 1989 y Wang, *et al.*, 1987). La prueba de la ureasa, evidenció claramente la presencia de dos grupos de microorganismos conservados y obviamente confundidos en el cepario, provenientes ambos de agallas de huitlacoche; donde la gran mayoría (20) fueron ureasa negativos y sólo uno fue ureasa positivo (Cuadro 1); es decir, que la gran mayoría correspondieron a levaduras del grupo ascomycete, mientras que la cepa M3-A791 correspondió a un basidiomycete, grupo al que pertenece *U. maydis* (Schaad *et al.*, 2001) (Figura 1).

Detección molecular de *U. maydis*

Los iniciadores específicos utilizados en la PCR citados por Xu *et al.* (1999) amplificaron un fragmento de 900 pb solamente en la cepa M3-A791 que la identificó como *U. maydis*; mientras que en las levaduras no se obtuvo resultado alguno con dicha reacción. Este fragmento de 900 pb también se detectó en DNA obtenido directamente del tejido interno de agallas de huitlacoche frescas, resultado que indicó la presencia de *U. maydis* en el complejo de la agalla (Figura 2). Sin embargo, cabe mencionar que aun cuando se detectó al hongo de interés en esta muestra, el tratar de aislarlo a partir de esa mezcla de microorganismos, su desarrollo se vio inhibido debido a la rápida invasión de

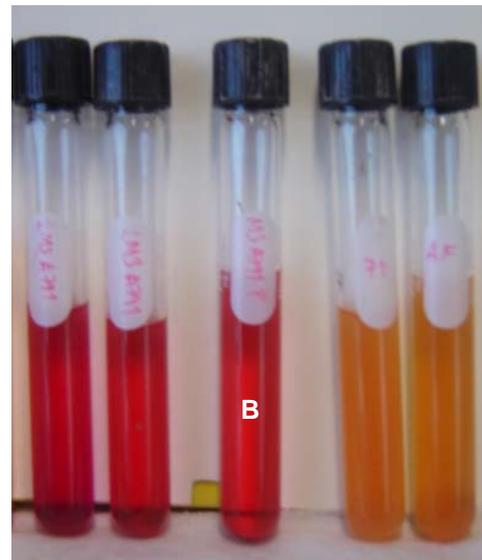
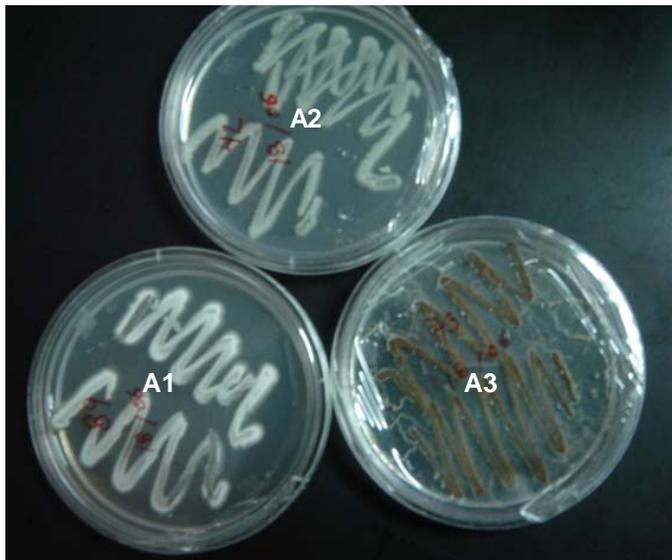


FIGURA 1. A: Desarrollo de aislamientos obtenidos de agallas de huitlacoche fresco. A1 y A2 corresponden a levaduras del género *Candida* y *Pichia* respectivamente y A3 a *Ustilago maydis*; nótese la coloración marrón de *Ustilago maydis* respecto al color que muestran las levaduras después de 8 días de cultivo en medio PDA. La Figura B es el resultado de la reacción de ureasa positiva de *U. maydis* (rojo) y ureasa negativa de las levaduras (amarillo).

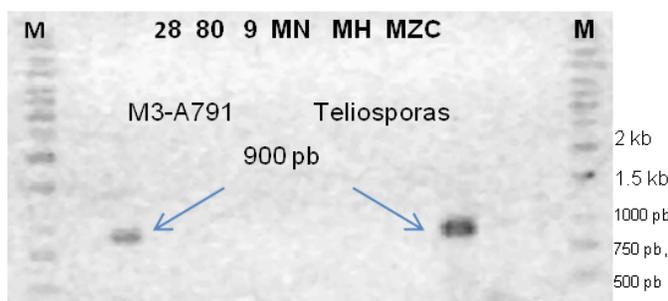


FIGURA 2. Fragmento de 900 pb que identificó a *Ustilago maydis* amplificado con DNA de la cepa M3-A791 y teliosporas tomadas directamente de una agalla comercial fresca. Los carriles restantes corresponde a *Candida quercitrusa* (28), *C. railenensis* (80 y MH) y *Pichia guilliermondii* (9, MN y MZC) que no mostraron amplificación alguna. M es el marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas).

las levaduras en el medio de cultivo, lo que dificultó su purificación.

Amplificación y secuenciación de ITS de los microorganismos aislados de agallas de huitlacoche

Con la finalidad de conocer la identidad de los microorganismos asociados al huitlacoche, se amplificó y se secuenció un fragmento de aproximadamente 625 pb obtenido con los iniciadores específicos para ITS. El orden de las bases nitrogenadas en estos fragmentos provenientes de los aislamientos de la colección de *Ustilago maydis*, indicaron que pertenecen a dos especies del género *Candida*: *Candida railenensis* (cepas 26, 81, MNH', MN', MH, MH' y MZC') y *C. quercitrusa* (cepas 28 y 70); y al género *Pichia*: *Pichia guilliermondii* (cepas 9, 42, 65, 71, 73, 89, MNH, MN

y MZC). La presencia de estos microorganismos en agallas de huitlacoche recolectados de campo en diferentes épocas durante la conformación del cepario, sugieren que en algún momento durante la patogénesis de *U. maydis* coinciden ambos microorganismos en la misma estructura (agalla como resultado de la infección de *U. maydis*). Esta situación tiene una alta probabilidad de ocurrir, pues las levaduras habitan diferentes nichos como, agua, flores y frutos y algunas están asociadas a insectos; aunque el suelo es el principal reservorio de estos microorganismos (Deak y Beuchat, 1996); esto explica de algún modo que las levaduras, en este caso del género *Pichia* y *Candida* aparezcan en el medio de cultivo cuando se pretende asilar a *U. maydis*. Esta situación de asociación entre levaduras y *U. maydis* no había sido previamente reportada.

Efecto antagonista de levaduras sobre *Ustilago maydis*

Los resultados del efecto antagonista entre *U. maydis* y las dos cepas de levaduras (cepas 71 y 81) utilizadas para este fin fue muy claro, ya que ambas mostraron un efecto invasivo sobre el desarrollo de *U. maydis*, debido a su rápido desarrollo sobre las colonias (basidiosporas) del hongo en el medio PDA (Figura 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos grupos de investigación en estudios realizados en otras asociaciones de microorganismos; por ejemplo, Mari y Guizzardi, (1998); Ízgü *et al.* (2006); y Chanchaichaovivat *et al.* (2007) señalaron que las levaduras pueden tener efectos negativos sobre otros microorganismos por competencia, producción de metabolitos o parasitismo. Por otro lado, Polonelli y Morace (1986); Ízgü *et al.* (2006) y Chanchaichaovivat *et al.* (2007) también reportaron que las levaduras tienen un efecto antagónico contra microorganismos procariontes y

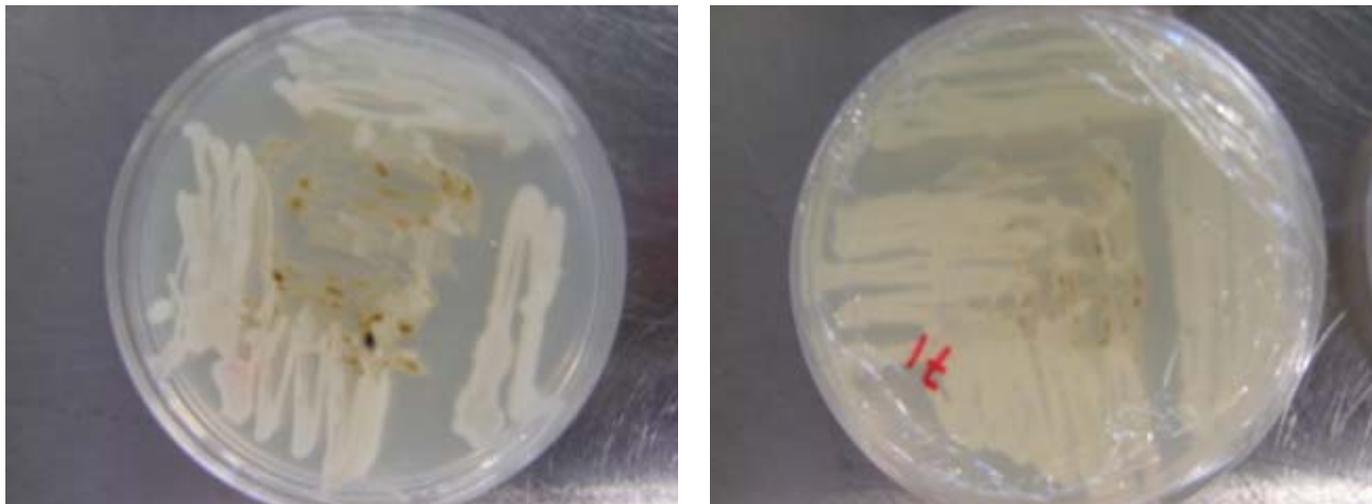


FIGURA 3. Crecimiento en medio de cultivo de levaduras antagonistas a *U. maydis* (colocado en el centro de la caja). Obsérvese el desarrollo invasivo de las levaduras del género *Candida* (izquierda) y *Pichia* (derecha) identificadas en este estudio sobre el desarrollo de *U. maydis*.

eucariontes. Este comportamiento en condiciones de laboratorio puede explicar en parte, la razón por la cual al tratar de aislar del huitlacoche fresco cepas de *U. maydis*, lo que se obtuvo predominante fueron levaduras. Del mismo modo, al tratar de purificar dichos aislamientos, el desarrollo de las levaduras fue mayor que el de *U. maydis*, eliminándose a éste durante los procesos de purificación; y que debido al aspecto similar de las colonias de ambos organismos en el medio PDA, fue tardado aislar el hongo de interés.

CONCLUSIONES

Las cepas de levaduras y *Ustilago maydis* presentaron en medio de cultivo papa dextrosa agar las características culturales siguientes: colonias claras cremosas, mate y mucoides; mientras que la cepa M3-A791, cambió a color marrón después de mantenerse por ocho días en medio de cultivo.

La prueba bioquímica de ureasa permite separar e identificar tanto a las cepas de *Ustilago maydis* (M3-A791 y AC) como a las levaduras de manera práctica.

La detección con el marcador específico de 900 pb fue una herramienta precisa y rápida para diferenciar *Ustilago maydis* del complejo de levaduras.

La comparación de secuencias ITS es una herramienta que permitió identificar a tres diferentes especies del complejo de levaduras asociadas a huitlacoche.

Las levaduras obtenidas de agallas de huitlacoche correspondieron a las especies *Candida railenensis*, *C. quercitrusa* y *Pichia guilliermondii*.

Las levaduras *Candida railenensis* (cepa 81) y *Pichia*

guilliermondii (71) asociadas a las agallas de huitlacoche, mostraron un efecto antagónico de tipo invasivo (parasitismo) sobre el crecimiento de *Ustilago maydis*. Por el momento se desconoce con precisión el mecanismo de acción de estas levaduras.

AGRADECIMIENTO

Se agradece el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 47725 "Producción controlada e intensiva de huitlacoche (*Ustilago maydis* D.C. Corda) y alternativas para su manejo en poscosecha".

LITERATURA CITADA

- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, 42(3): 326-335.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; PANIJPAN, B.; RUENWONGSA, P. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control*, 47(2): 207-215.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeast*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- ÍZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; ACUN T. 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4): 669-676.
- KRONSTAD, J. W.; LEONG, S. A. 1989. Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 978-982.
- MARI, M.; GUIZZARDI, M. 1998. The Postharvest Phase: Emerging Technologies for the Control of Fungal Diseases. *Phytoparasitica* 26: 59-66.

- ORBERÁ, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam. Micol. 21: 15-19.
- PATAKY, J. K. 1999. Production of huitlacoche [*Ustilago maydis* (DC) Corda] on sweet corn. Hortscience 26: 1374-1377.
- POLONELLI, L.; MORACE, G. 1986. Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. Journal of Clinical Microbiology 24: 866-869.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2^a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSH)
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3a. APS PRESS p. 47.
- VACCARI, S. 2001. Caratterizzazione strutturale e funzionale di peptide ad attivita' antibiotica. Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare. Università Degli Studi di Parma.
- VILLANUEVA, V. C. 1997. "Huitlacoche" (*Ustilago maydis*) As a food in Mexico. Micol. Neotrop. Apl. 10: 73-81.
- WANG, J.; HOLDEN, D.; LEONG, S. 1987. Gen Transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Proc. Natl. Acad. Scri. USA 85: 865-869.
- XU, L. M.; MELCHINGER, E. A.; LÜBBERSTEDT, T. 1999. Species-Specific Detection of the Maize Pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by Dot Blot Hybridization and PCR-Based Assays. Plant. Dis.