

## **Celulasas durante la infección de *U. maydis* al *Z. mays***

**Flores Villavicencio L. L., Sabanero López M. L. y Leal Morales C. A.**

**Instituto de Investigación en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Gto. México**

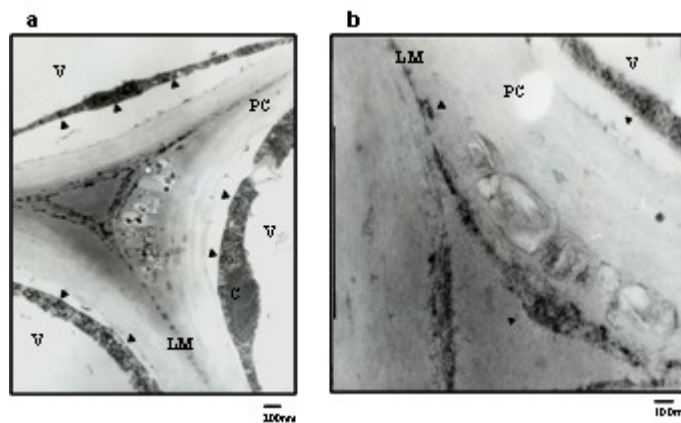
**+52 473 73 20006 ext. 8159 email: [leri\\_00@hotmail.com](mailto:leri_00@hotmail.com)**

*U. maydis* es un hongo basidiomiceto dimórfico, la forma unicelular o esporidia es levaduriforme, haploide y uninucleada, y presenta crecimiento saprofitico, la forma filamentosa es dicariótica, la cuál es parasítica y patogénica. Además presenta una forma diploide, la teliospora, la cuál es solamente formada en los tumores [2,6]. *U. maydis* infecta solo al maíz (*Zea mays*) y al teocinte (*Zea mexicana*), el probable progenitor del maíz. La enfermedad inducida por este hongo es conocida como “tizón del maíz” o “cuitlacoche”, nombre Náhuatl por el cuál se conoce en México. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de tumores en las hojas, tallos, espigas y mazorcas; las mazorcas infectadas una delicia culinaria [2, 6, 11]. El desarrollo de la enfermedad está caracterizado por la presencia de clorosis (amarillamiento del tejido), producción de antocianinas las cuales se observan como un pigmento violáceo, y la formación de los tumores [3, 5, 6, 13, 14]. *U. maydis* requiere infectar la planta de maíz para completar su ciclo de vida, la importancia de las enzimas líticas como factores de patogenicidad ha sido sujeto de gran controversia, porque la disrupción de un gen en particular, en ocasiones, no tiene efecto sobre el proceso patogénico [1, 7, 12]. Sin embargo, las enzimas líticas se han implicado en muchos aspectos de patogenicidad como: la penetración, la maceración del tejido, la adquisición de nutrientes y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad [1, 9]. No obstante lo anterior, se desconocen los finos mecanismos que llevan al proceso patogénico. En este estudio se planteó conocer el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en su interacción con el maíz.

Secciones de tejido de hojas de maíz (variedad HV313) de 12 días post-infección con la cepa FB-D12 de *U. maydis* con genotipo  $a_1b_1/a_2b_2$  (la cual fue proporcionada por la Dra. Flora Banuett de la Universidad de California, San Fco. USA.), se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con los anticuerpos: anti-endoglucanasa de *T. reesei* y un segundo anticuerpo acoplado a oro coloidal 10 nm. Las preparaciones se procesaron para microscopia electrónica de transmisión efectuando la fijación con glutaraldehído 2% en cacolidato de sodio 0.5M, post-fijación con  $OsO_4$ , deshidratación secuencial con etanol e inclusión en resina epon. Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico JEOL 1200EXII en la Unidad de Microscopia del IFC-UNAM. Para la determinación de la actividad celulolítica se recolectaron hojas infectadas de 12 días post-infección, las cuales fueron pulverizadas para la obtención de la fracción soluble. A dicha fracción se determinó la actividad celulolítica mediante la producción de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogy (1952).

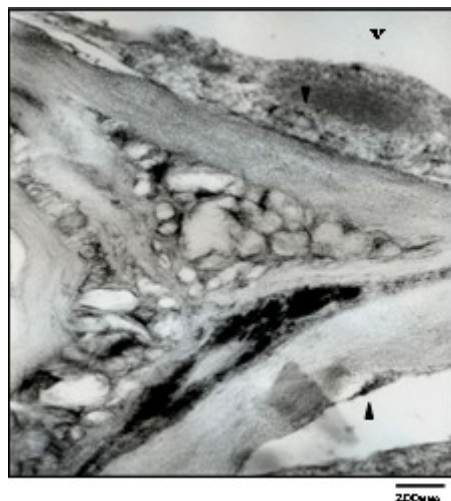
En el tejido infectado se encontró una mayor actividad celulolítica con respecto al control (tejido no infectado) de 0 a 384.6  $\mu\text{g gpo. reductor /mg prot}$ , indicando una inducción de la actividad celulolítica. Por microscopia electrónica de transmisión en células de hojas infectadas de la interacción *U. maydis* – *Z. mays* se observó la inmunolocalización de las celulasas en la pared celular vegetal, principalmente se visualizan alteraciones ultraestructurales en la pared celular, la unión entre la pared celular y la membrana plasmática fue modificada ya que muestra espacios irregulares debido al desprendimiento de la pared celular (Fig. 1). En la lamina media se observaron irregularidades en la estructura, como protuberancias y la acumulación de material electrodensito (Fig. 1 y 2). Además la acumulación de almidón en cloroplastos de tejidos de 12 d.p.i. (Fig. 3). Estas alteraciones sugieren el daño causado por el crecimiento de *U. maydis* debido a la secreción de enzimas líticas en el tejido vegetal, entre ellas las celulasas de *U. maydis*, ya que se observaron partículas de oro coloidal las cuales no se encontraron distribuidas uniformemente pero se localizaron en el área dañada lo cual indicó la

presencia de las celulasas (Fig. 1, 2, y 3). Estos datos se correlacionan con los obtenidos por Snetselaar y Mims (1994), donde los autores observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) el crecimiento intracelular de *U. maydis* en hojas de maíz de 3 días de infección, el hinchamiento y la acumulación de almidón en los cloroplastos. Así como la observación de que la membrana plasmática vegetal permanece intacta durante etapas tempranas de la interacción. En *U. maydis* se han reportado 33 enzimas líticas que en comparación con otros hongos patógenos como 138 y 103 de *Magnaphorte grisea* y *Fusarium graminearum*, respectivamente son pocas [10]. Nuestros resultados indican, que la actividad de las celulasas participan en la degradación parcial y localizada de la pared celular en acuerdo con el estilo de vida biotrófico de *U. maydis*. Sin embargo, se requiere de la clasificación bioquímica y molecular de las celulasas inducidas durante el proceso.



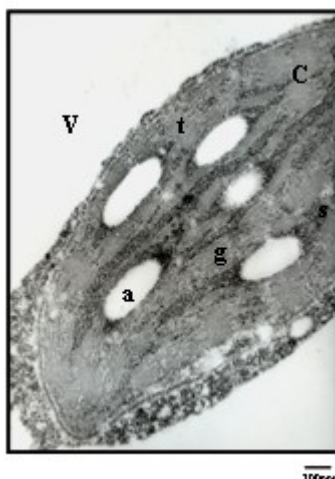
**Figura 1. Lamina media de tejido de hoja de maíz infectada con la cepa FB-D12 de *U. maydis***

Secciones de tejido de hoja de maíz infectada con la cepa FB-D12 de *U. maydis* de 12 días pos-infección fue tratada con: anticuerpos policlonales contra endoglucanasa y un anticuerpo acoplado a oro coloidal de 10 nm. Las cabezas de la flecha indican el marcaje con oro coloidal. V, vacuola; PC, pared celular vegetal; LM, lamina media; C, cloroplasto.



**Figura 2. Lamina media de tejido de hoja de maíz infectada con la cepa FB-D12 de *U. maydis***

Secciones de tejido de hoja de maíz infectada con la cepa FB-D12 de *U. maydis* de 12 días pos-infección fue tratada con: anticuerpos policlonales contra endoglucanasa y un anticuerpo acoplado a oro coloidal de 10 nm. Las cabezas de la flecha indican el marcaje con oro coloidal. V, vacuola; PC, pared celular vegetal; LM, lamina media; C, cloroplasto.



**Figura 3. Tejido de hoja de maíz infectada con la cepa FB-D12 de *U. maydis***

Secciones de tejido de hoja de maíz infectada con la cepa FB-D12 de *U. maydis* a 12 días post-infección fue tratada con: anticuerpos policlonales contra endoglucanasa y un anticuerpo acoplado a oro coloidal de 10 nm. V, vacuola; PC, pared celular; t, tilacoides; g, grana; C, cloroplasto, a, almidón.

#### Bibliografía

- [1] Akimitsu K., Isshiki A., Ohtani K., Yamamoto H., Eshel D. and Prusky D. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65(2004): 271-275
- [2] Banuett F. *Annual Review Genetics* 29 (1995): 179-208.
- [3] Banuett F. and Herskowitz I. *Development* 122 (1996): 2965-2976.
- [4] Basse C. W.. *Plant Physiol* 138 (2005): 1774-1784.
- [5] Cano Canchola C., Acevedo L., Ponce Noyola P., Flores Martínez A., Flores Carreón A., and Leal Morales C. A. *Fungal Genetics and Biology* 29 (2000): 145-151.
- [6] Christensen J. J. (1963). *Corn smut caused by Ustilago maydis*. American Phytopathology Society Monograph, No.2 St. Paul: American Phytopathology Society, pp. 1-41
- [7] Doehlemann Gunther, Wahl R., Vranes M., R. P. de Vries, Kämper J., Kahmann R. *Journal of Plant Physiology* 165(2008): 29-40.
- [8] García Pedrajas M. D. and Gold S. E. *Mol. Plant Pathology*. 5 (2004): 295-300
- [9] Jackson A. O. and Taylor C. B *The Plant Cell* 8(1996): 1651-1668
- [10] Klosterman S. J., Perlin M. H., García Pedrajas M., Corvert S. F. and Gold S. E. *Advances in Genetics* 57(2007): 1-47.
- [11] Ruíz Herrera J. and Martínez Espinoza A. D.. *Int. Microbiol.* 1(1998): 149-158
- [12] Schauwecker F., Wanner G., and Kahmann R. *Biol. Chem.* 376 (1985):617-625.
- [13] Snetselaar K. M. and Mims C. W. *Mycologia* 84 (1992): 193-203.
- [14] Snetselaar K. M. and Mims C. W. *Phytopathology* 83 (1993): 843-850.

Tema: Biología celular

Modalidad: Cartel

Autores:

Dr. Carlos Alberto Leal Morales

Profesor Investigador

Instituto de Investigación en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Gto. México  
+52 473 73 20006 ext. 8159 lealc@quijote.ugto.mx

Dra. Mirna Loreto Sabanero López

Profesor Investigador

Instituto de Investigación en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Gto. México  
+52 473 73 20006 ext. 8158 myrna@quijote.ugto.mx

M. en C. Lérica Liss Flores Villavicencio

Estudiante de Doctorado

Instituto de Investigación en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Gto. México  
+52 473 73 20006 ext. 8158 leri\_00@hotmail.com