

OBTENCIÓN DE CEPAS INFECTIVAS DE *Ustilago maydis* PARA LA PRODUCCIÓN DE HUITLACOICHE EN LA SOCIEDAD RURAL MEXICANA

OBTAINING INFECTIOUS STRAINS OF *Ustilago maydis* FOR HUITLACOICHE PRODUCTION IN MEXICAN RURAL SOCIETY

Víctor Macuil-Tlachino¹, Mercedes Sobal-Cruz^{2*}, Daniel Martínez-Carrera¹, Porfirio Morales-Almora², Benjamín Peña-Olvera², María R. Maimone-Celorio³

¹Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM), Campus Puebla, Colegio de Postgraduados, Boulevard Forjadores de Puebla no. 205, Puebla 72760, Puebla, México (macuil.victor@colpos.mx, dcarrera@colpos.mx). ²Colegio de Postgraduados. Campus Puebla, Boulevard Forjadores de Puebla no. 205, Puebla 72760, Puebla, México (msobal@colpos.mx, pmorales@colpos.mx, bpena@colpos.mx). ³Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), Facultad Biotecnoambiental, Barrio de Santiago, Puebla 72410, Puebla, México (mariarosa.maimone@upaep.mx)

RESUMEN

Ustilago maydis es un hongo dimórfico con una forma levaduriforme no patogénica, y una filamentosa patogénica que es la responsable de la formación de tumores en maíz. *U. maydis* es conocido en México como huitlacoiche y consumido desde épocas prehispánicas. Actualmente, su producción se limita a la recolección silvestre para autoconsumo y de manera asistida con fines de mercado, para ello es necesario contar con cepas de *U. maydis* con capacidad de infección. En el presente trabajo se aislaron esporidias infectivas a partir de huitlacoiche nativo de la región de Cholula, Puebla, México. Se preparó el inoculo en medio líquido a una concentración de 1×10^6 y 5×10^6 esporidias mL^{-1} , la concentración del inoculo se midió en un espectro de UV y con el conteo de esporidias en cámara de Neubauer. Se seleccionaron 6 esporidias nativas y se cruzaron con dos cepas de referencia, la CP-436 y CP-437, para la formación de híbridos infectivos. El material seleccionado se comprobó *in-vivo* mediante la infección de plántulas de maíz de la variedad HUE-CP-14. Las cepas infectivas⁴ nativas fueron las esporidias e7 y e11 de la cepa CP-897, con formación de agallas en invernadero a los 7 días de infección en plántulas de maíz, y los heterocariones e7xCP-436, e7xCP-437, e11xCP-436, e11xCP-437, e14xCP-437, e7xe11, e14xe18 y CP-436xCP-437, como híbridos infectivos a los 14 días de inoculación en promedio.

Palabras clave: agallas, densidad óptica, infección en plántulas, inóculo, huitlacoiche, *Zea mays*.

ABSTRACT

Ustilago maydis is a dimorphic fungus with a non-pathogenic yeast-like form, and a pathogenic filamentous one that is responsible for the formation of tumors in maize. *U. maydis* is known in Mexico as *huitlacoiche* and consumed since Pre-Hispanic times. Currently, its production is limited to collection in the wild for subsistence consumption and with assistance for market purposes, and for this reason it is necessary to have strains of *U. maydis* with a capacity for infection. In this study infectious sporidia were isolated from native *huitlacoiche* from the Cholula region in Puebla, Mexico. The inoculum in liquid medium was prepared at a concentration of 1×10^6 and 5×10^6 sporidia mL^{-1} ; the concentration of the inoculum was measured in a UV spectrum with sporidia counts in Neubauer chamber. Six native sporidia were selected and crossed with two reference strains, CP-436 and CP-437, for the formation of infectious hybrids. The material selected was tested *in vivo* through the infection of maize seedlings of the variety HUE-CP-14. The native infectious strains were sporidia e7 and e11 of the strain CP-897, with formation of galls in the greenhouse at 7 days of maize seedling infection, and heterokaryons e7xCP-436, e7xCP-437, e11xCP-436, e11xCP-437, e14xCP-437, e7xe11, e14xe18 and CP-436xCP-437 as infectious hybrids at 14 days of inoculation on average.

Key words: Galls, optical density, seedling infection, *Ustilago* inoculum, *huitlacoiche*, *Zea mays*.

INTRODUCTION

Ustilago maydis belongs to the Ustilaginales, an order of Basidiomycetes characterized for producing spores in specialized structures

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2017. Aprobado: agosto, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en ASyD 18: 335-345. 2021.

INTRODUCCIÓN

U*stilago maydis*, pertenece a los Ustilaginales, un orden de los basidiomicetos caracterizados por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios, que incluye patógenos fúngicos semiobligados de plantas, comúnmente conocidos como carbones. La agalla del maíz contiene células diploides llamadas teliosporas; en estas últimas ocurre la meiosis, para dar origen a la forma haploide (esporidias) y reiniciar el ciclo de vida (Valinluck *et al.*, 2010). Para el desarrollo de la forma dicariótica patogénica es necesaria la fusión de dos esporidias compatibles, con dos loci genéticos que funcionan como un sistema de apareamiento, el locus *a* y *b* (Heimel *et al.*, 2010).

Como hongo parásito del maíz, el huitlacoche es consumido en México. Existen tres sistemas de producción, la esporádica en los cultivos de maíz, la inducción empírica, y la producción asistida o controlada (Castañeda de León *et al.*, 2019). En cuanto al primer sistema, Ruiz-Herrera (2008), mencionó que tan sólo entre 1 y 5% de plantas de los cultivos de maíz son infectadas naturalmente por *U. maydis*. El tercer sistema representa retos biotecnológicos muy diferentes al de los hongos saprófitos que se cultivan comúnmente, como *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. La mayoría de las investigaciones se centran en la infección de jilotes de maíz para la producción controlada de huitlacoche (Castañeda de León y Leal Lara, 2012).

En México Madrigal-Rodríguez *et al.* (2010), propusieron la utilización de híbridos formados a partir de esporidias para generar un inóculo que asegure la infección. El presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar cepas infectivas nativas de *U. maydis* basadas en el entrecruzamiento de 20 esporidias para incrementar la producción de huitlacoche (*U. maydis*) en México, y producir inóculo de manera estandarizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las esporidias utilizadas en este trabajo se aislaron de la cepa CP-897 de *Ustilago maydis* (C.D.) Corda, procedente de la localidad de Cholula,

called basidia, which include semi-forced plant fungi pathogens, commonly known as smuts. The maize galls contain diploid cells called teliospores, where meiosis takes place, giving rise to the haploid form (sporidia) and restarting the life cycle (Valinluck *et al.*, 2010). For the development of the pathogenic dikaryotic form, the fusion of two compatible sporidia is necessary, with two genetic loci that function as a mating system, loci *a* and *b* (Heimel *et al.*, 2010).

As parasite fungi to maize, *huitlacoche* is consumed in Mexico. There are three production systems: sporadic in maize crops, empirical induction, and assisted or controlled production (Castañeda de León *et al.*, 2019). In terms of the first system, Ruiz-Herrera (2008) mentioned that just between 1 and 5% of plants from the maize crops are infected naturally by *U. maydis*. The third system represents very different biotechnological challenges to those of saprophyte fungi that are commonly cultivated, such as *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. Most studies are focused on the infection of maize *jilotes* for the controlled production of *huitlacoche* (Castañeda de León and Leal Lara, 2012).

In Mexico, Madrigal-Rodríguez *et al.* (2010) proposed the use of hybrids formed from sporidia to generate an inoculum that guarantees infection. This study had the objective of selecting native infectious strains of *U. maydis* based on the cross-breeding of 20 sporidia to increase production of *huitlacoche* (*U. maydis*) in Mexico, and to produce inoculum in a standardized manner.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

The sporidia used in this study were isolated from the strain CP-897 of *Ustilago maydis* (C.D.) Corda, from the locality of Cholula, Mexico. In addition, two haploid strains were used as reference, FB1 and FB2 (California State University, Long Beach, CA, USA), deposited and kept in Colegio de Postgraduados with the registration numbers CP-436 and CP-437, respectively. The hybrid HUE-CP-14 is a maize variety formed with materials of white grain, it has a very precocious cycle that adapts to soil conditions with poor to intermediate levels of fertility, and has medium resistance to lodging.

México. Además, se utilizaron dos cepas haploides de referencia FB1 y FB2 (California State University, Long Beach, CA, U.S.A) depositadas y resguardadas en el Colegio de Postgraduados con los registros de CP-436 y CP-437, respectivamente. El híbrido HUE-CP-14, es una variedad de maíz formada con materiales de grano blanco, es de ciclo muy precoz que se adapta a condiciones de suelos con nivel de fertilidad pobre a intermedia, tiene mediana resistencia al acame.

Aislamiento y cultivo de esporidias nativas

Para el aislamiento de la cepa se tomaron tejidos de las agallas y se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v). Una vez limpias se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se realizó una serie de diluciones con 500 μ L de agua destilada estéril; se tomaron 10 μ L de cada dilución y depositaron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA (Difco) para aislar cultivos monospóricos. Los cultivos multitelioesporicos se aislaron y se registraron con la clave CP-897. Cada teliospora aislada se incubó en cajas de Petri con medio PDA a 25 °C por 120 horas; con un asa microbiológica se propago el cultivo, posteriormente de esa colonia se tomó una muestra y se diluyó en 500 μ L de agua destilada estéril para realizar otra serie de microdiluciones; se inocularon 10 μ L de cada dilución en PDA para aislar sólo una esporidia por caja de Petri. Las esporidias aisladas se incubaron a 25 °C por 72 horas, se caracterizó la morfología de la colonia de cada una de las esporidias en el microscopio estereoscópico (Zeiss) y se registraron con la clave "e" más el número de esporidia.

Selección de esporidias

Se cruzaron entre sí 20 esporidias aisladas de la CP-897, colocando la siembra de forma paralela con una separación de 5 mm, en medio de cultivo PDA más carbón activado al 10% (Hycel de México). Se observó evidencia de entrecruzamiento por el cambio de morfología de las cruzas con respecto de su morfología original (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997). Las cruzas positivas fueron aquellas colonias con morfología algodonosa y blanca. Una craza negativa presentó colonias con morfología cremosa, no filamentosa y crecimiento levaduriforme (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997). Seleccionadas las esporidias

Isolation and cultivation of native sporidia

Tissue from galls was taken for isolation of the strain, and they were washed with a solution of sodium hypochlorite at 1% (v/v). Once clean, they were placed in Eppendorf tubes of 1.5 mL and a series of dilutions with 500 μ L of sterile distilled water were made; 10 μ L were taken from each dilution and deposited in Petri dishes with PDA culture medium (Difco) to isolate monosporic cultures. The multiteliosporic cultures were isolated and recorded with the registration number CP-897. Each isolated teliospore was incubated in Petri dishes with PDA medium at 25 °C for 120 hours; the culture was propagated with an inoculation loop, then a sample was taken from that colony and diluted in 500 μ L of sterile distilled water to carry out another series of microdilutions; 10 μ L of each dilution in PDA were inoculated to isolate only one sporidium per Petri dish. The isolated sporidia were incubated at 25 °C for 72 hours, the morphology of the colony was characterized from each of the sporidia in the stereoscopic microscope (Zeiss) and registered with the key "e" plus the number of sporidium.

Sporidia selection

There were 20 sporidia cross-bred isolated from CP-897, seeding in parallel with a separation of 5 mm, in a PDA culture medium plus activated carbon at 10% (Hycel, Mexico). Evidence was observed of cross-breeding by the change of morphology from the crosses compared to their original morphology (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997). The positive crosses were those colonies with cotton-like and white morphology. A negative cross presented colonies with creamy, non-filamentous and yeast-like growth (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997). Once the CP-897 sporidia were selected, they were crossed with the reference strains CP-436 (a_1b_1) and CP-437 (a_2b_2) in PDA plus activated carbon, taking as a basis the trials to determine the sexuality pattern of basidiomycete fungi (Martínez-Carrera, 1988).

Elaboration of the inoculum

Samples were taken from unicellular cultures of *U. maydis* with an inoculum loop and each was incubated in 8 flasks of 125 mL with 30 mL of malt liquid

de la CP-897 se cruzaron con las cepas de referencia CP-436 (a_1b_1) y CP-437 (a_2b_2), en PDA más carbón activado tomando como base los ensayos para determinar el patrón de sexualidad de hongos basidiomicetes (Martínez-Carrera, 1988).

Elaboración de inóculo

De cultivos unicelulares de *U. maydis*, con un asa microbiológica se tomó una muestra y se incubaron cada una en 8 matraces de 125 mL con 30 mL de medio líquido malta (Bioxon), se incubaron a 24°C durante 24 horas a 140 rpm en un agitador orbital (MAXQ4001 ThermoScientific) con agitación orbital. Se tomaron alícuotas a las 4, 8, 12 y 24 horas para determinar la curva de crecimiento por conteo en la cámara de Neubauer. Se realizó el perfil de barrido espectrofotométrico de las cepas de referencia de *U. maydis* CP-436 y CP-437 en medio de cultivo líquido malta con el objeto de determinar la correlación de la absorbancia con la concentración de esporidias contadas en la cámara de Neubauer; para lo cual en una microplaca de 96 pozos se colocó 100 μL de cada cultivo y se leyó en un lector de microplacas (Epoch, Biotek) en un rango de 200 a 990 nm. Se hicieron diluciones de la concentración inicial de incubación, y se determinó la concentración de todas las diluciones en la cámara de Neubauer; y se graficó contra la concentración calculada con la cámara de Neubauer contra la absorbancia obtenida para obtener una ecuación de tercer grado, que representó el sistema, y permitió determinar la concentración a partir de la densidad óptica. Calculada la concentración, se realizó el ajuste de la concentración para que al formar el dicarion se obtuviera una concentración final de 1×10^6 esporiadias·mL⁻¹, y otra de 5×10^6 esporiadias·mL⁻¹; con excepción de los tratamientos donde solo se inoculó cada clase por separado.

Cultivo de maíz

Para la siembra del material vegetal, se utilizaron 22.5 kg de tierra negra y se colocaron en bolsas para invernadero (25 cm x 50 cm). Se humedeció la tierra a capacidad de campo (CC) un día antes de la siembra. Se sembraron las semillas de maíz HUE-CP-14 a una profundidad de 7 cm, con 3 semillas por bolsa y cubriéndolas con tierra.

medium (Bioxon), incubated at 24 °C during 24 hours at 140 rpm in an orbital agitator (MAXQ4001 Thermo Scientific) with orbital agitation. Aliquots were taken at 4, 8, 12 and 24 hours to determine the growth curve from counting in the Neubauer chamber. The profile of spectrophotometric scan of the reference strains of *U. maydis* CP-436 and CP-437 was conducted in malt liquid culture medium with the objective of determining the correlation of absorbance with the concentration of sporidia counted in the Neubauer chamber, for which 100 μL from each culture were placed in a microplate of 96 wells and read in a microplate reader (Epoch, Biotek) in a range of 200 to 990 nm. Dilutions were made of the initial concentration of incubation, and the concentration of all the dilutions was determined in the Neubauer chamber, and graphed against the concentration calculated with the Neubauer chamber with the absorbance obtained to obtain a third-degree equation, which represented the system and allowed defining the concentration from the optical density. Once the concentration was calculated, the adjustment of the concentration was conducted so that a final concentration of 1×10^6 sporidia·mL⁻¹ and another of 5×10^6 esporidia·mL⁻¹ would be obtained when forming the dikaryon, with the exception of treatments where each class was inoculated separately.

Maize cultivation

For sowing the plant material, 22.5 kg of black soil was used and placed in greenhouse bags (25 cm x 50 cm). The soil was moistened at field capacity (FC) one day before sowing. The HUE-CP-14 maize seeds were sown at a depth of 7 cm, with 3 seeds per bag, and covered with soil.

Infection in maize seedlings

Maize infection was carried out at between 2 to 3 weeks of development of the maize plant. To infect the seedlings, 3 equidistant punctures were made along plants of 45 cm height, with the help of a 3 mL syringe and hypodermic 21 g x 32 mm needle (Medical, DI), 1 milliliter of inoculum was injected per puncture of each concentration of sporidia (1×10^6 ·mL⁻¹ and 5×10^6 ·mL⁻¹).

Infección en plántulas de maíz

La infección del maíz se realizó entre 2 a 3 semanas de desarrollo de la planta de maíz. Para la infección de las plántulas, se realizaron 3 punciones equidistantes a lo largo de plantas de 45 cm de altura, con la ayuda de una jeringa de 3 mL y aguja 21 g × 32 mm hipodérmica (D1 medica), se inyectó 1 mililitro de inóculo por punción de cada concentración de esporidias ($1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ y $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$).

Selección de cepas infectivas de *U. maydis*

La selección de las cepas infectivas de *U. maydis* se realizó tomando en cuenta la aparición de agallas y la formación de teliosporas en las plántulas de maíz. Se realizó un diseño experimental completamente al azar para comprobar su infección in-vivo y considerando la concentración del inóculo y la cepa como fuentes de variación se sometió a un análisis de varianza en el programa SAS versión (9.0). Se seleccionaron las esporidias e7 y e11 como principales cepas infectivas; la cruza e2xe21 como control negativo, dado que ninguna de las dos esporidias mostraron reacción con las esporidias e7 y e11; y la cruza e14xe18 como control positivo, ya que únicamente fueron positivas entre ellas, el testigo fue la cruza de las cepas de referencia (CP-436xCP-437) y plántulas de maíz sin inocular como blanco para comparar el desarrollo de la plántula, cada tratamiento tuvo 6 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las 20 esporidias, se generaron los cruzamientos intra-específicos. Se realizaron 190 cruzas; de las cuales 49 (más de 25%) fueron positivas, 12 correspondieron a cruzas con las esporidias e12, e14, e16, e18, e22, e24, e25, e28, y e30, y 37 correspondieron al entrecruzamiento que dieron las esporidias e7 y e11 con cada una de las esporidias, debido a que su reacción siempre fue positiva este comportamiento indicó heterocariosis, morfológicamente coincide con la descripción de Galicia-García *et al.* (2016), llamadas cepas solopatogénicas con crecimiento algodonoso, capaces de infectar el maíz o de producir agallas.

Las 8 cepas de *U. maydis* utilizadas en la infección de plántulas de maíz agrupadas por su compatibilidad se muestran en el Cuadro 1. En la clase I quedaron las

Selection of infectious strain of *U. maydis*

The selection of infectious strains of *U. maydis* was carried out taking into account the appearance of galls and the formation of teliospores in maize seedlings. A completely random experimental design was used to test its *in vivo* infection; considering the concentration of inoculum and the strain as sources of variation, it was subjected to variance analysis in the SAS software version (9.0). The sporidia e7 and e11 were selected as main infectious strains; the e2xe21 cross was used as negative control, given that none of the two sporidia showed reaction with sporidia e7 and e11; and the cross e14xe18 was used as positive control, since they were only positive between them; the control was the cross of the reference strains (CP-436xCP-437) and maize seedlings without inoculating as a target, to compare the development of the seedling each treatment had 6 replicas.

RESULTS AND DISCUSSION

The intra-specific crosses were generated from 20 sporidia; 190 crosses were made, from which 49 (more than 25%) were positive, 12 corresponded to crosses with sporidia e12, e14, e16, e18, e22, e24, e25, e28, and e30, and 37 corresponded to cross-breeding that happened between sporidia e7 and e11 with each one of the sporidia. Because their reaction was always positive, this behavior indicated heterokaryosis, and coinciding morphologically with the description by Galicia-García *et al.* (2016), called solopathogenic strains with cotton-like growth, capable of infecting maize or producing galls.

Cuadro 1. Ubicación de las esporidias de *Ustilago maydis* (CP-897) en sus clases de compatibilidad.

Table 1. Location of *Ustilago maydis* (CP-897) sporidia in their compatibility classes.

CLASE I	CLASE II
(a ₁ b ₁)	(a ₂ b ₂)
CP-436	CP-437
e2	e21
e14	e18
Heterocarioses	
e7	
e11	

que reaccionaron positivamente con la cepa CP-437, y en la clase II las que reaccionaron positivamente con la cepa CP-436. En el caso de los patrones de sexualidad para hongos basidiomicetos se toma en cuenta la aparición de fíbulas para determinar una reacción positiva entre dos cepas (Martínez-Carrera, 1988). Mientras que, en el caso de *U. maydis* se tomó en cuenta las características fenotípicas algodonosa y de color blanco de las colonias para determinar la crucea positiva (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997).

Del barrido espectrofotométrico se presentaron 2 longitudes de onda que se presume son efecto de la absorbancia de esporidias (Echevarría *et al.* 2008), la primera a 292 nm presentó mayor absorbancia que la segunda (364 nm), por lo que se realizó la correlación entre observancia y la concentración de esporidias (Figura 1).

Una vez establecida la longitud de onda para evaluar la concentración de esporidias, se correlacionó la densidad óptica contra la turbidez del inóculo. La lectura a 292 nm, mostró una amplitud de entre 1 a 3 unidades de absorbancia, con un coeficiente de correlación de 0.955, las diluciones se colocaron de la más concentrada $D1=8.5 \times 10^8$ esporidias mL^{-1} a la más diluida $D6=9.7 \times 10^3$ esporidias mL^{-1} , y el blanco al final $B=0$ (medio liquido malta), las lecturas a 292 nm tuvieron un rango mayor en comparación a la longitud de onda de 364 nm el cual fue de entre 0.1 a 1.5 unidades de absorbancia (Figura 2).

En la Figura 3 se muestran las lecturas de densidad óptica a 292 nm, de las cepas de *U. maydis* durante 24 horas de incubación. Las absorbancias

The 8 strains of *U. maydis* used in the infection of maize seedlings grouped by their compatibility are shown in Table 1. Class I included those that reacted positively with strain CP-437, and class II those that reacted positively with strain CP-436. In the case of the sexuality patterns for basidiomycete fungi, the appearance of fibulas was taken into account to determine a positive reaction between two strains (Martínez-Carrera, 1988). Meanwhile, in the case of *U. maydis* the cotton-like and white phenotypical characteristics from the colonies were taken into account to determine the positive cross (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997).

From the spectrophotometric scan, 2 wavelengths were presented that are presumed to be the effect from the absorbance of sporidia (Echevarría *et al.*, 2008), the first at 292 nm presented higher absorbance than the second (364 nm), so the correlation between observance and concentration of sporidia was performed (Figure 1)

Once the wavelength to evaluate the concentration of sporidia was established, the optical density was correlated against the turbidity of the inoculum. The reading at 292 nm showed an amplitude of between 1 to 3 units of absorbance, with a correlation coefficient of 0.955; the dilutions were placed from the most concentrated of $D1=8.5 \times 10^8$ sporidia mL^{-1} to the most diluted of $D6=9.7 \times 10^3$ sporidia mL^{-1} , and the final target of $B=0$ (malt liquid medium); the readings at 292 nm had a higher range compared to the wavelength of 364 nm which was between 0.1 to 1.5 units of absorbance (Figure 2).

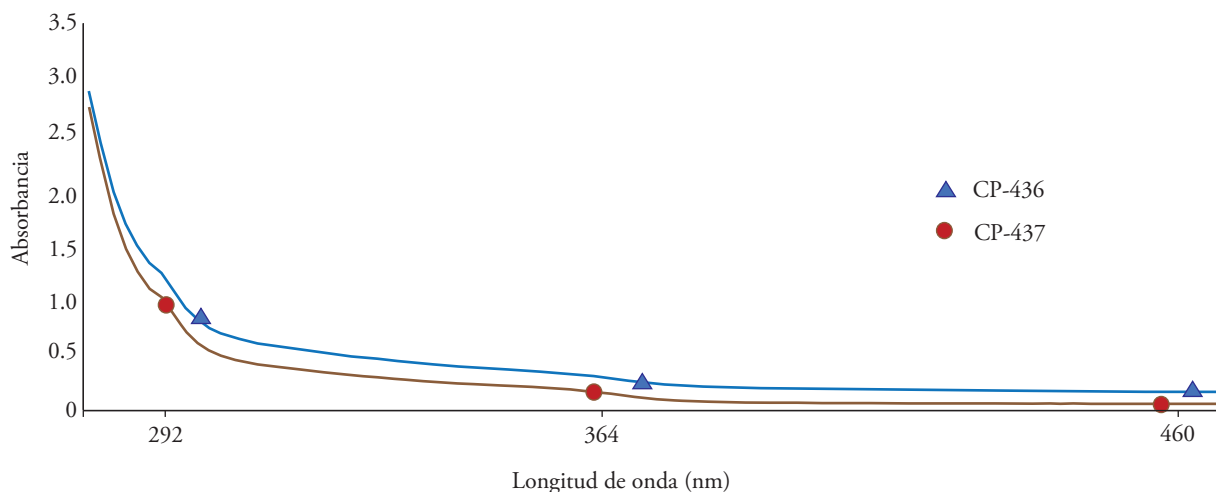


Figura 1. Barrido en el espectrofotómetro de UV de las cepas CP-436 y CP-437 de *Ustilago maydis* a 12 horas de incubación.
Figure 1. UV spectrophotometer scans of strains CP-436 and CP-437 of *Ustilago maydis* at 12 hours of incubation.

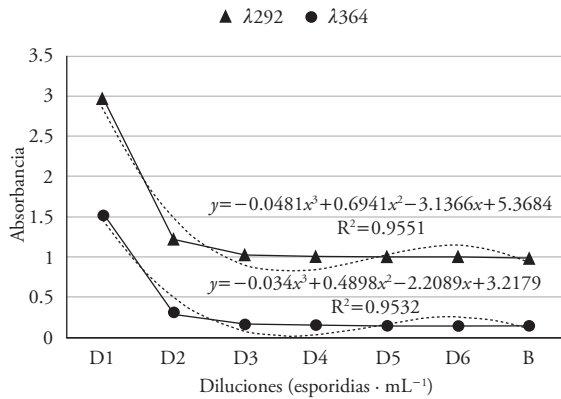


Figura 2. Absorbancia de las diluciones de esporidias de referencia (CP-436 y CP-437) de *U. maydis* a $\lambda = 292$ y $\lambda = 364$ nm. D1-D6: Diluciones. B: Blanco.

Figure 2. Absorbance of the reference dilutions of sporidia (CP-436 and CP-437) of *U. maydis* at $\lambda = 292$ and $\lambda = 364$ nm. D1-D6: Dilutions. B: Target.

más altas correspondieron a las cepas nativas, debido a la alta concentración de esporidias (esporidias mL⁻¹). Las cepas de referencia quedaron por debajo de las nativas, siendo la cepa CP-437 la de mayor crecimiento en comparación con la cepa CP-436.

Para corroborar el conteo de esporidias por los dos métodos (densidad óptica y cámara de Neubauer), se analizaron las variables tiempo, absorbancia y concentración en una matriz de correlación de Pearson. El tiempo y la absorbancia presentaron una R² de 0.76 ($p \leq 0.0001$). El tiempo y la concentración tuvieron

Figure 3 shows the readings of optical density at 292 nm, from the *U. maydis* strains during 24 hours of incubation. The highest absorbances corresponded to the native strains, due to the high concentration of sporidia (sporidia mL⁻¹). The reference strains below under the native ones, with strain CP-437 being the one of most growth compared to the strain CP-436.

To corroborate the sporidia count based on the two methods (optical density and Neubauer chamber), the variables time, absorbance and concentration were analyzed in a Pearson's correlation matrix. The time and the absorbance presented R² of 0.76 ($p \leq 0.0001$). The time and the concentration had R² of 0.81 ($p \leq 0.0001$). Meanwhile, the absorbance and the concentration presented R² of 0.85 ($p \leq 0.0001$), that is, the main correlation was found between these last variables.

Thakur *et al.* (1989), Valdez *et al.* (2009), Galicia-García *et al.* (2016) and Castañeda de León *et al.* (2019) used 1×10^6 sporidia mL⁻¹ as reference concentration in the preparation of inoculum at 24 and 48 hours of incubation in malt liquid medium or PDA, diluting to reach the concentration through a cell recount. Since the first 4 hours the reference strains had on average 346 500 sporidia mL⁻¹, and the native strains 622 250 sporidia mL⁻¹; while at 12 hours of incubation the reference strains had on average 3 417 500 sporidia mL⁻¹, and the native strains 32 166 667 sporidia mL⁻¹. With time the number of sporidia continued to increase, making its

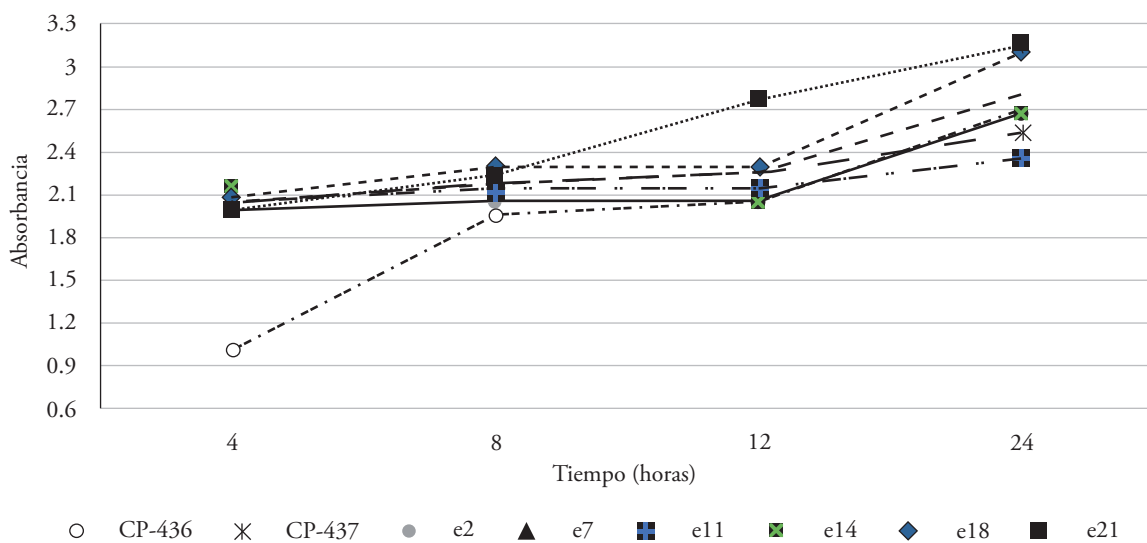


Figura 3. Concentración de las esporidias de referencia y nativas de *Ustilago maydis* a 292 nm.

Figure 3. Concentration of reference and native sporidia of *Ustilago maydis* at 292 nm.

una R^2 de 0.81 ($p \leq 0.0001$). Mientras que la absorbancia y la concentración presentaron una R^2 de 0.85 ($p \leq 0.0001$), es decir, que la principal correlación se encontró entre estas últimas variables.

Thakur *et al.* (1989), Valdez *et al.* (2009), Galicia-García *et al.* (2016) y Castañeda de León *et al.* (2019) utilizaron 1×10^6 esporidias mL^{-1} como concentración de referencia en la preparación de inóculo a 24 y 48 horas de incubación en medio líquido malta o PDA, diluyendo para alcanzar la concentración mediante un recuento celular. A partir de las primeras 4 horas las cepas de referencia tuvieron en promedio 346 500 esporidias mL^{-1} , y las cepas nativas 622 250 esporidias mL^{-1} ; mientras que, a las 12 horas de incubación las cepas de referencia tuvieron en promedio 3 417 500 esporidias mL^{-1} , y las cepas nativas 32 166 667 esporidias mL^{-1} . Con el tiempo siguió aumentando el número de esporidias dificultando su manipulación, a 24 horas de incubación el inóculo se volvió denso y fue difícil tomar un volumen exacto, por esta razón se estableció un tiempo máximo de incubación de 12 horas para todas las cepas de *U. maydis*.

Las plantas de maíz HUE-CP-14 sembradas, presentaron la infección con inóculos a diferentes concentraciones (1×10^6 y 5×10^6 esporidias mL^{-1}), en ambos se produjeron agallas de huitlacoche (Figura 4).

En la concentración de 1×10^6 esporidias $\cdot \text{mL}^{-1}$ se apreció la formación de agallas mayoritariamente en la parte aérea de las plántulas de maíz, cerca de las hojas; mientras que, la infección con el inóculo a una concentración de 5×10^6 esporidias $\cdot \text{mL}^{-1}$ la infección se formó en la base del tallo de las plántulas. En ambos casos se formaron teliosporas, brindando un color negro a las agallas. Se comprobó estadísticamente el efecto de la concentración del inóculo con respecto al tiempo de aparición de agallas, con un valor de F calculada de 0.55, evidenciando que no existieron diferencias significativas en el promedio del tiempo de formación de agallas entre concentraciones. Varias cepas tardaron incluso hasta 21 días en manifestar la aparición de agallas de cada material seleccionado (Cuadro 2). Las esporidias e7, e11 y el cruzamiento CP-437xe14 produjeron agallas a los 7 días. Las cruces CP-436xCP-437, e7xe11, e14xe18, CP-436xe7, CP-436xe11 y CP-437xe7 manifestaron la aparición de agallas a los 14 días después de la inoculación. A los 21 días, las plántulas de maíz inoculadas con el híbrido CP-437xe11 manifestaron la aparición del huitlacoche en el tallo de la plántula.

manipulación difícil; at 24 hours of incubation the inoculum became dense and it was difficult to take an exact volume, reason why a maximum incubation time of 12 hours was established for all the strains of *U. maydis*.

The maize plants HUE-CP-14 sown presented the infection with inoculates at different concentrations (1×10^6 and 5×10^6 sporidia mL^{-1}), and *huitlacoche* galls were produced in both (Fig. 4).

In the concentration of 1×10^6 sporidia mL^{-1} the formation of galls appeared mostly in the aerial part of the maize seedlings, close to the leave; meanwhile, with the inoculum at a concentration of 5×10^6 sporidia mL^{-1} the infection was formed in the base of the seedling stem. In both cases teliospores were formed, giving black color to the galls. The effect of the concentration of the inoculum was statistically proven with regard to the time of appearance of galls, with an F value calculated of 0.55, evidencing that there were no significant differences in the average time of formation of galls between concentrations. Several strains took up to 21 days to manifest the appearance of galls from each material selected (Table 2). The sporidia e7, e11 and the cross-breed CP-437xe14 produced galls at 7 days. The crosses CP-436xCP-437, e7xe11, e14xe18, CP-436xe7, CP-436xe11 and CP-437xe7 manifested the appearance of galls at 14 days after inoculation. At 21 days, the maize seedlings inoculated with hybrid CP-437xe11 manifested the appearance of *huitlacoche* on the seedling stem.

Obtaining infectious strains such as e7, e11 (native strains) and a cross of a native sporidium with a type of foreign origin like e14xCP-437, will allow to facilitate the technology of *huitlacoche* production for producers, since as mentioned by Castañeda de León and Leal Lara (2012) and Galicia-García *et al.* (2016), doing it intensively is of utmost importance. In addition, strains e7, e11 and e14xCP-437 showed evidence of formation of *huitlacoche* before the commercial reference strains (CP-436xCP-437). The maize grain is a good food in the diet of the Mexican society, although once the fungus transforms the grain into *huitlacoche*, the main nutritional values increase considerably (Valdez *et al.*, 2010), obtaining in this way a product of great added value that would favor the diet and the income of rural Mexican society.



Figura 4. Infección de plántulas de maíz de la variedad HUE-CP-14 a diferentes concentraciones de esporidias de *Ustilago maydis*, con el híbrido formado entre CP-437xe14.

Figure 4. Infection of maize seedlings of the variety HUE-CP-14 at different concentrations of sporidia of *Ustilago maydis*, with the hybrid formed between CP-437xe14.

Obtener cepas infectivas como la e7, e11 (cepas nativas) y una cruce de una esporidia nativa con un tipo de procedencia extranjera como la e14xCP-437, permitirá facilitar la tecnología de producción de huitlacoche para los productores, ya que como mencionan Castañeda de León y Leal Lara (2012) y Galicia-García *et al.* (2016), hacerla de manera intensiva es sumamente importante. Además, las cepas e7, e11 y e14xCP-437 mostraron evidencia de formación de huitlacoche antes que las cepas comerciales de referencia (CP-436xCP-437). El grano de maíz es un buen alimento en la dieta de la sociedad mexicana, pero una vez que el hongo logra transformar al grano a huitlacoche, los principales valores nutrimentales crecen de manera considerable (Valdez *et al.*, 2010), obteniendo de esta forma un producto de gran valor agregado que favorecería la dieta y el ingreso de la sociedad rural mexicana.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 2 cepas (e7 y e11) infectivas nativas, y un heterocarión (e14xCP-437) infeccioso nativo cruzado con uno extranjero. Se logró evidenciar la

CONCLUSIONS

Two infectious native strains (e7 and e11) were obtained, and one infectious native heterokaryon (e14xCP-437) crossed with a foreign one. The quantification of sporidia was evidenced in a malt liquid medium at a wavelength of 292 nm. The calculation of sporidia was simplified per milliliter for the elaboration of inoculum in *huitlacoche* production. Increasing the concentration five times more than the standard inoculum did not present a significant difference in the time of appearance of galls. The maize seedlings serve to test the infection and the appearance of galls.

—End of the English version—



cuantificación de esporidias en medio líquido malta a una longitud de onda de 292 nm. Se simplificó el cálculo de esporidias por mililitro para la elaboración de inóculo en la producción de huitlacoche. Incrementar la concentración 5 veces más que el inóculo

Cuadro 2. Aparición de agallas (días) en las plántulas del híbrido de maíz CP-HUE-14 utilizado para probar la infección de todos los recursos fúngicos seleccionados de *Ustilago maydis*.

Table 2. Appearance of galls (days) in seedlings of the maize hybrid CP-HUE-14 used to test the infection of all fungi resources selected from *Ustilago maydis*.

Registro	Tiempo de infección (días)			
	7	14	21	28
Blanco	-	-	-	-
CP-436	-	-	-	-
CP-437	-	-	-	-
e2	-	-	-	-
e7	+	+	+	+
e11	+	+	+	+
e14	-	-	-	-
e18	-	-	-	-
e21	-	-	-	-
CP-436xCP-437	-	+	+	+
e2xe21	-	-	-	-
e7xe11	-	+	+	+
e14xe18	-	+	+	+
CP-436xe2	-	-	-	-
CP-436xe7	-	+	+	+
CP-436xe11	-	+	+	+
CP-436xe14	-	-	-	-
CP-436xe18	-	-	-	-
CP-436xe21	-	-	-	-
CP-437xe2	-	-	-	-
CP-437xe7	-	+	+	+
CP-437xe11	-	-	+	+
CP-437xe14	+	+	+	+
CP-437xe18	-	-	-	-
CP-437xe21	-	-	-	-

(+): Presencia de agallas; (-): Ausencia de agallas. ♦ (+): Presence of galls; (-): Absence of galls.

estándar no presentó una diferencia significativa en el tiempo de aparición de agallas. Las plántulas de maíz sirven para probar la infección y la aparición de agallas.

NOTAS

⁴Investigación financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto FORDECYT-273647 dirigido por D. Martínez-Carrera.

LITERATURA

Castañeda de León, V., y Leal Lara, H. 2012. Logros y desafíos de la producción masiva de huitlacoche *Ustilago maydis* en México. En: J. Sánchez, & G. Mata, Hongos comestibles en Iberoamérica. Tapachula, Chiapas: El Colegio de la Frontera Sur. pp: 193-206.

Castañeda de León, V., Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Gil-Muñoz, A., Severiano-Pérez, P., y Leal-Lara, H. 2019. Productivity and flavor of diverse genotypes of *Ustilago maydis* "cuitlacoche" for human consumption. Fungal Biology 123 (6): 481-488.

Echevarria, L., Ortega, M. A., Rodriguez, L., y Castillo, J. 2008. Obtención y caracterización de nanopartículas coloidales empleando métodos ópticos. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 6(1): 1-9.

Galicia-García, P. R., Silva-Rojas, H. V., Mendoza-Onofre, L. E., Zavaleta-Mancera, H. A., Córdova-Téllez, L., y Espinosa-Calderón, A. 2016. Selection of aggressive pathogenic and solopathogenic strains of *Ustilago maydis* to improve Huitlacoche production. Acta Botanica Brasilica 30(4): 683-692.

Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., y Kämper, J. 2010. The Transcription Factor Rbfl1 Is the Master Regulator for *b*-Mating Type Controlled Pathogenic Development in *Ustilago maydis*. PLoS Pathog 6(8): e1001035. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001035>

Madrigal-Rodríguez, J., Villanueva-Verduzco, C., Sahagún-Castellanos, J., Acosta-Ramos, M., Martínez-Martínez, L.,

- y Espinosa-Solares, T. 2010. Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. Revista Chapingo. Serie Horticultura 16(3): 177-182.
- Martínez-Carrera, D. 1988. Hibridación entre cepas de *Pleurotus ostreatus* de México y Guatemala. Revista Mexicana de Micología 4: 281-286.
- Martínez-Espinoza, A. D., León, C., Elizarraraz, G., y Ruiz-Herrera, J. 1997. Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. Phytopathology 8(3): 259-265.
- Ruiz-Herrera, J. 2008. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. Nova Scientia 1(1): 118-135.
- Thakur, R. P., Leonard, K. J., y Pataky, J. K. (1989). Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. Plant Disease 73(11): 921-925.
- Valdez, M. M., Barry, K., Fahey, G. C., Domínguez, J., González de Mejía, E., Valverde, M. E., y Paredes, L. O. 2010. Effect of maize genotype, developmental stage and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). Food Chemistry 119(2): 689-997.
- Valdez, M. M., Valverde, M. E., Vanegas Espinoza, P. E., y Paredes-López, O. 2009. Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinco. pp: 10-37.
- Valinluck, M., Ahlgren, S., Sawada, M., Locken, K., y Banuett, F. 2010. Role of the nuclear migration protein Lis1 in cell morphogenesis in *Ustilago maydis*. Mycologia 102(3): 493-512.