

Revista Electrónica Nova Scientia

Identificación de las proteínas secretadas por el hongo *Ustilago maydis* (DeCandole) Corda (Basidiomiceto) cultivado en condiciones *in vitro*

Identification of proteins secreted by the fungus *Ustilago maydis* (DeCandole) Corda (Basidiomicete) grown under *in vitro* conditions

Andrés Adolfo Estrada-Luna^{1,3}, Alicia Chagolla López², Hilda Eréndira Ramos Aboites², Angelina Guerrero Ambriz¹ y José Ruiz Herrera³

¹ Escuela de Agronomía, Universidad De La Salle Bajío, León, Gto.

² Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto.

³ Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto.

México

Andrés Adolfo Estrada-Luna. Universidad De La Salle Bajío y CINVESTAV-IPN Irapuato. e-mail: aestradaluna@yahoo.com

© Universidad De La Salle Bajío (México)

Resumen

Introducción: *Ustilago maydis* es un hongo basidiomiceto que infecta al maíz y teozintle produciendo una enfermedad conocida como carbón común o huitlacoche. Actualmente no existen reportes acerca del secretoma del hongo cultivado bajo condiciones *in vitro*. Un estudio de esta naturaleza permitiría caracterizar los genes involucrados en varios procesos importantes, entre los que se tienen aquellos relacionados con la nutrición, la patogenicidad y la diferenciación del hongo. El objetivo de esta investigación fue identificar las proteínas secretadas al medio de cultivo por las formas de levadura o micelio de este hongo cultivado en dos condiciones de pH.

Método: Se generaron las formas de micelio o levadura de *Ustilago maydis* (cepa FB2—a2b2) a través del cultivo en medios mínimos con pH 3 y 7 respectivamente y se determinó su cinética de crecimiento. Las proteínas secretadas al medio se concentraron en una columna de fase reversa Sep-Pak Plus C18 y se eluyeron con una solución de acetonitrilo (60 %) + ácido trifluoroacético (0.1 %), seguida de su liofilización parcial, y precipitación con ácido tricloroacético-acetona. Posteriormente las muestras fueron sometidas a electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) y los geles teñidos con azul de Coomassie. Las bandas de proteína se cortaron del gel y se digirieron con tripsina. Las mezclas de péptidos fueron inyectados para su análisis en un espectrómetro de masas y el espectro MS/MS obtenido fue procesado en Masslynx 4.0 antes de someterlo al programa MASCOT (Matrix Science) para realizar las búsquedas no-redundantes en la base de datos del National Center for Biotechnology Information.

Resultados: El crecimiento de *U. maydis* a pH 7 fue mayor que a pH 3 (D.O. a 600 nm = 1.35 y 0.85, respectivamente) a las 30 h de incubación. El proceso dimórfico de levadura a micelio a pH 3 se inició a las 8 h después de iniciados los cultivos. A las 30 h de cultivo se observó que el 100 % de las células tenían una morfología micelial. A este tiempo, se colectó el sobrenadante y se sometió al proceso descrito anteriormente, obteniéndose de manera reproducible 8 bandas de proteína del medio mínimo del cultivo a pH 7 y 2 del medio mínimo del cultivo de pH 3. Las proteínas se analizaron, pero solo fue posible identificar 5, todas ellas provenientes del medio de pH 7, cuyas masas teóricas oscilan entre 31 y 68 kDa y presentan valores de punto isoeléctrico calculados en un rango de 4.72 a 10.13. Cuatro de las 5 proteínas fueron identificadas como de secreción de *U. maydis*. Tres de las 5 proteínas son de función desconocida, una está relacionada

con el precursor de la spherulin 4 y la última parece ser una proteína GPI (glycosyl phosphatidylinositol) relacionada con una glucanasa.

Discusión o Conclusión: Los resultados aquí presentados son los primeros datos descritos de proteínas secretadas al medio en condiciones *in vitro* por la forma de levadura de *U. maydis*. Con este trabajo se establecieron las bases para el estudio posterior del secretoma del hongo.

Palabras Clave: proteómica, secretoma, huitlacoche, *Ustilago maydis*.

Recepción: 07-04-10

Aceptación: 25-05-10

Abstract

Introduction: *Ustilago maydis* is a fungus included in the group of Bacidiomycete that host maize and teocinte plants producing a disease known as common smut or huitlacoche. Today, there are no reports regarding the secretome of this organism grown under *in vitro* conditions. This information might be useful to characterize the genes involved in several important processes such as those related to nutrition, pathogenicity and fungus differentiation. The main objective of this study were to identify the proteins differentially expressed and secreted into the culture media by both the sporidia and mycelium forms grown in two conditions of pH and analyzed through the mapping in SDS-PAGE gels.

Methods: We initially generated the two morphological forms (sporidia and mycelium) of *Ustilago maydis* (strain FB2—a2b2) through its culture in minimal media with adjusted pH of 7 and 3, respectively, and the growth kinetics was determined. The secreted proteins to the culture medium were concentrated in a Sep-Pak Plus C18 and eluted with a solution of acetonitrile (60

%) + trifluoroacetic acid (0.1 %) followed by a partial liophilization and precipitation with trichloroacetic acid-acetone solution. After this step, the protein samples were subjected to a polyacrilamide (SDS-PAGE) electrophoresis and stained with Coomassie blue for mapping. The protein bands obtained were cut from the gels and digested with trypsin. Then, the mix of peptide samples were injected in a mass spectrometer for analysis and the obtained MS/MS spectra were then analyzed with Masslynx 4.0 before being subjected to MASCOT (Matrix Science) to perform non-redundant searches on the National Center for Biotechnology Information data base.

Results: After 30 h of inoculation, the growth kinetics of *U. maydis* cultivated at pH 7 was consistently higher compared to pH 3 (O.D. at 600 nm= 1.35 and 0.85, respectively). The process of dimorphism from sporidia to mycelia at pH 3 began 8 hours after inoculation. Thirty hours after inoculation, we observed that 100 % of cells had differentiated into mycelia. At this time, the supernatant was collected and processed as previously described, obtaining 8 reproducible bands of proteins from the minimal medium at pH 7 and 2 from the minimal medium of pH 3. All proteins were analyzed, however, only 5 from media at pH 7 were identified and their theoretical mass ranged between 31 to 68 kDa showing calculated isoelectrical points between 4.72 y 10.13. Four out of the five proteins were identified as secretion proteins of *U. maydis*. Three of the five proteins have an unknown function, one of them is related to the Spherulin 4 Precursor, and the remaining one seems to be a GPI (glycosyl phophotidylinositol) related to Glucanase.

Discussion or Conclusion: Our results are the first set of data describing secreted proteins to the media under conditions *in vitro* by the sporidial form of *U. maydis*. With this research we established the bases to study the secretome of the fungus.

Keywords: proteomics, secretome, huitlacoche, *Ustilago maydis*.

Introducción

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto que parasita específicamente al maíz (*Zea mays* L.) y a su probable ancestro el teozintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*), a los que produce la enfermedad conocida como huitlacoche o carbón común del maíz (Agrios, 2005). Este hongo pertenece al orden Ustilaginales, que es un grupo relevante de organismos porque incluye patógenos de importancia agrícola que causan enfermedades conocidas como “carbones” en unas 4,000 especies de angiospermas pertenecientes a 75 familias (Agrios, 2005; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). *U. maydis* puede atacar a sus huéspedes en cualquier estadio de crecimiento, produciendo síntomas que incluyen el desarrollo de clorosis, el desarrollo de tumores en mazorcas, espigas, hojas y tallos, los cuales dan como resultado alteraciones en la morfología de la planta y reducción del crecimiento y la producción de grano (Agrios, 2005; Banuett, 1992; 1995; Klosterman, 2007; Ruíz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Villanueva Verduzco *et al.*, 2007), dando lugar a pérdidas económicas considerables en los cultivos comerciales de maíz (Agrios, 2005; Immer y Christensen, 1928; 1931; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002).

U. maydis es un hongo biotrófico dimórfico que en su fase haploide crece en forma de levaduras unicelulares saprófitas que se dividen por gemación. La fase diploide o sexual se inicia con la fusión de dos células haploides sexualmente compatibles, las cuales se unen mediante un tubo de conjugación para dar lugar a un dicarion, el cual es filamentoso (micelio). Este cambio provoca que el hongo se transforme en patogénico y parásito obligado (Banuett y Herkowitz, 1989; Banuett, 1992; 1995; Kahmann y Kämper, 2004; Klosterman, 2007; Klosterman *et al.*, 2007). Durante el crecimiento invasivo del micelio en la planta, las hifas del hongo proliferan y se diferencian dentro del tejido del huésped induciendo hiperplasia y tumores donde se acumulan las esporas diploides o teliosporas de color negro (Agrios, 2005; Banuett, 1995; Kahmann y Kämper, 2004; Klosterman, 2007), las cuales al ser liberadas al medio ambiente germinan sufriendo una ronda de meiosis y produciendo 4 basidiosporas, que al germinar reinician el ciclo de vida del hongo (Banuett, 1992; Banuett y Herskowitz, 1994). El ciclo de vida del hongo puede ser completado en dos o tres semanas bajo condiciones controladas de invernadero (Villanueva, 1997; Villanueva Verduzco *et al.*, 2007).

U. maydis ha sido considerado como modelo biológico desde mediados de la década de los 40's para el estudio de los aspectos básicos de la patogénesis fúngica en plantas, la especificidad en el apareamiento, la recombinación genética, los genes que participan y controlan el proceso de dimorfismo, entre otros (Ruíz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Bölke, 2001; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Holliday, 2004; Klosterman, 2007). Este particular interés lo ha convertido en el miembro del orden Ustilaginales más estudiado en la actualidad (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). El genoma de *U. maydis* ha sido secuenciado y anotado (Kämper *et al.*, 2006), revelando que posee un genoma relativamente pequeño (20.5 Mb) que codifica aproximadamente 6,500 genes, y posee un reducido número de intrones (Kämper *et al.*, 2006; Klosterman, 2007). El análisis funcional del genoma reveló que un número significativo de genes codifica enzimas de secreción estando ordenados en 12 grupos con 3 a 6 genes cada uno, que probablemente representan islas de patogenicidad, las cuales se encuentran distribuidas en todo el genoma (Kämper *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2008). Algunos grupos científicos actualmente están enfocados en estudios de genómica funcional; sin embargo, poco se ha avanzado en aspectos de análisis proteómico, lo cual resultaría importante para entender los mecanismos de las modificaciones post-traduccionales, el cambio sistemático en el flujo metabólico, etc. Un aspecto relevante en el estudio de los hongos filamentosos es el análisis del secretoma, el cual se define como la combinación de las proteínas nativas secretadas, así como la maquinaria celular involucrada en el proceso (Tjalsma, 2000), ya que estos organismos sintetizan un gran número de enzimas que son empleadas como parte de los mecanismos de degradación de sustratos para poder alimentarse y atacar a sus huéspedes.

U. maydis es un hongo que sintetiza y secreta diversos compuestos al medio ambiente resultantes de su metabolismo primario y secundario, los cuales incluyen aminoácidos (Kurtz y Ericson, 1962), glicolípidos (toxinas activas contra microorganismos procarióticos y eucarióticos (Haskins y Thorn, 1951), sideróforos (involucrados con la adquisición y almacenamiento del ión Fe^{3+}), y antibióticos y compuestos derivados de triptófano, algunos de los cuales actúan como reguladores del crecimiento y que se relacionan con el proceso de infección del hongo (Bölker *et al.*, 2008). Respecto de las proteínas que el hongo secreta, pocos trabajos han sido descritos (Yonghyun *et al.*, 2007). Böhmer *et al.* (2007) llevaron a cabo un estudio de proteínas citosólicas solubles sintetizadas durante el dimorfismo, y Müller *et al.* (2008) generaron mutantes y a través de

análisis bioinformáticos identificaron proteínas relacionadas con la patogénesis. Mueller *et al.* (2008), usando estrategias bioinformáticas, analizaron y agruparon las proteínas que constituyen el secretoma del hongo. Actualmente no existen reportes acerca del secretoma del hongo cultivado bajo condiciones *in vitro*. Un estudio de esta naturaleza permitiría caracterizar los genes involucrados en varios procesos importantes, entre los que se tienen aquellos relacionados con la nutrición, la patogenicidad y la diferenciación del hongo. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue identificar las proteínas expresadas diferencialmente y secretadas al medio de cultivo por *Ustilago maydis* cultivado en dos condiciones de pH que permiten el crecimiento en forma de levadura o micelio.

Materiales y Métodos.

Cepa Experimental y condiciones de cultivo

La cepa de *Ustilago maydis* empleada en la presente investigación fue la FB2, que es un haploide silvestre con un genotipo *a2b2*, y la cual fue proporcionada por Flora Banuett (California State University, Long Beach, CA, U.S.A.). La cepa se mantuvo congelada a -70°C en un ultracongelador (REVCO, Legaci Refrigeration System, Asheville, North Carolina, U.S.A.) en una solución de glicerol (UltraPure Glycerol, invitrogen, cat. No. 15514-001), al 50 % (v/v) disuelto con medio de cultivo completo.

Confirmación del tipo de apareamiento de la cepa de *U. maydis* usada

Para este fin se llevaron a cabo experimentos de apareamiento y confirmar el fenotipo “Fuzz” empleando cepas de genotipo conocido que incluyeron esporidias de FB2 (*a2b2*) y su contraparte compatible FB1 (*a1b1*). La prueba consiste en mezclar alícuotas de suspensiones celulares de las dos cepas, inocularlas juntas en placas con medio de cultivo mínimo o completo para *U. maydis* adicionado de 1% de carbón activado. Las placas se incuban a 28°C por un tiempo de 10 a 18 horas (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997).

Preparación de Medios para el Cultivo de U. maydis

De manera rutinaria se emplearon los medios de cultivo Medio Completo (MC) (Holliday, 1974) y Medio Mínimo (MM) (Holliday, 1974). El medio de cultivo fue preparado líquido o bien sólido, dependiendo las condiciones del cultivo. Cuando se preparó líquido, simplemente se agregaron los constituyentes y se aforó con agua desionizada (milli-Q). Para los cultivos sólidos en placa, se adicionó agar bacteriológico (12 g L^{-1}). El pH se ajustó a 3 con HCl (0.1 N) o a pH 7 con NaOH (0.1 M). Para el crecimiento en forma de levadura se empleó MM de pH 7, y para el cultivo de la forma micelial se empleó medio de pH 3 (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).

Cultivo del inóculo.

Para iniciar los cultivos, las células mantenidas en glicerol a -70°C se inocularon en MC sólido a pH 7 y se incubaron a 28°C durante 48 h para crecer colonias individuales. A partir de este cultivo, se sembró una colonia individual en MC líquido a pH 7, al cual se adicionaron $12.5 \mu\text{L}$ de carbenicilina (1 mg mL^{-1}) y se cultivó en una incubadora (Orbital Shaker Incubator, Hsiangtai Machinery Industry Co. Ltd, China) por 20 h a 28°C y 125 rpm de agitación. Las células se separaron por centrifugación, se lavaron con agua destilada estéril 3 veces por centrifugación, se resuspendieron en agua destilada estéril y se contaron con una cámara de Neubauer. Se inocularon 10^6 células mL^{-1} en 250 mL de MM de pH 7 y se cultivaron en una incubadora a 28°C y 125 rpm durante 20 h. Al cabo de este tiempo, las células se cosecharon por centrifugación y fueron lavadas por tres veces con agua destilada, resuspendidas en agua desionizada estéril y se incubaron a 28°C y 125 rpm durante 2 h para sincronizarlas en la fase Go (tratamiento de ayuno nutrimental). Al cabo de este tiempo, la suspensión celular se centrifugó a 700 g y 4°C durante 10 min, se decantó el agua y las células se resuspendieron en 30 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente las células se mantuvieron a 4°C durante al menos 30 min (tratamiento de choque térmico).

Cultivos Experimentales.

Los cultivos experimentales se establecieron en matraces de vidrio de 2 L de capacidad, en los cuales se inocularon 500 mL de medio mínimo a pH 3 (MM3) ó pH 7 (MM7) suplementados con 12.5 µL de carbenicilina (1mg mL⁻¹). Como inóculo se usó una población de 7.5×10^5 células por mililitro del inóculo previamente preparado. Las células se cultivaron durante 30 horas en una incubadora a 28° C y 125 rpm de agitación. Este tiempo de cultivo se estableció como el óptimo luego de analizar la cinética de crecimiento, para evitar la lisis celular, lo que daría lugar a la contaminación de las proteínas secretada con las liberadas durante la lisis celular. Durante los cultivos experimentales se tuvo cuidado de manipular de manera homogénea al inóculo y mantener uniformes y constantes las condiciones ambientales para el crecimiento de las células con objeto de tener resultados reproducibles.

Colecta y Concentración de las proteínas.

Al final del cultivo, se tomó una alícuota de 1 mL de cada suspensión celular (MM3 y MM7) para la determinación de la absorbencia de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec III UV/Visible, Pharmacia). También se comprobó por microscopía que los cultivos no estuviesen contaminados, así como la morfología celular. Después de esto, las células se eliminaron por centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en hielo. Para concentrar las proteínas del medio de cultivo, éste se acidificó con ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 % y se procedió a pasar la solución por una columna de fase reversa Sep-Pak Plus C18 Environmental Cartridge (WAT023635, Waters) previamente lavada con 6 volúmenes de acetonitrilo + TFA al 0.1 %, seguida de 6 volúmenes de agua milli-Q + TFA (0.1 %) con ayuda de una bomba peristáltica modelo TRISTM (ISCO, USA). El eluido de los 500 mL de medio se descartó, la elución de las proteínas se llevó a cabo con 7.5 mL de una solución al 60 % de acetonitrilo + TFA (0.1 %) que se llevaron inmediatamente a congelación a -70 °C a un ultracongelador (REVCO, Legaci Refrigeration System, Asheville, North Carolina, USA), en donde permanecieron hasta su procesamiento para el análisis de las proteínas. Todo este procesamiento de las muestras se llevó a cabo en un cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

Cuantificación de la Proteína

La concentración de las proteínas se midió por el método de Bradford (Bradford, 1976) con una solución comercial (B6916, Sigma™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las absorbencias fueron leídas en un espectrofotómetro µQuant Microplate (Biotek Instruments, Inc., USA) usando el software Gen5™.

Precipitación y limpieza de proteína con TCA-Acetona

Después de la purificación de la proteína de los medios de cultivo, las muestras se concentraron por liofilización hasta un volumen de 1ml, e inmediatamente después se precipitaron con 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 77 % en acetona toda la noche a -20 °C y se sedimentaron por centrifugación (700 g). Posteriormente se lavaron 3 veces con acetona a -20 °C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE en geles al 10 % usando el método de Schagger y von Jagow (1987) para proteínas de bajo peso molecular. Los geles fueron teñidos durante toda la noche con una solución de azul de Coomassie G al 0.025 % disuelto en ácido acético al 10 % y destañados con una solución de ácido acético al 10 %.

Digestión de las proteínas para su análisis

Las bandas de proteínas fueron cortadas del gel y digeridas con tripsina grado espectrometría de masas (Promega) de acuerdo al protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996). Finalmente, los segmentos del gel se incubaron dos veces durante 15 min en una solución de acetonitrilo: ácido fórmico:H₂O (60:5:35), se centrifugaron y se colectó el sobrenadante conteniendo los péptidos.

Análisis de las proteínas diferenciales

Después de la digestión, las muestras de péptidos fueron inyectados para su análisis en un espectrómetro de masas (Q-ToFII Micromass Spectrometer, Waters, Milford, MA, USA). Las muestras fueron analizadas en el “Survey Mode” bajo el control del programa “Masslynx 4.0 (Waters). El espectro MS/MS obtenido fue procesado en Masslynx 4.0 antes de someterlo al programa MASCOT (Matrix Science) para realizar las búsquedas no-redundantes en la base de datos del National Center for Biotechnology Information.

Resultados

Análisis de la cinética de crecimiento de *U. maydis* en las formas de levadura o micelio y estandarización de los cultivos

Previamente al inicio de los experimentos, se confirmó la identidad de la cepa empleada (FB2) a través de la determinación de su tipo de apareamiento (a_2b_2) mediante la prueba tipo “Fuzz”. Los resultados obtenidos confirmaron dicha identidad (Figura 1), ya que como resultado de esta reacción se obtuvo el desarrollo de dos tipos de colonias después de 20 horas de cultivo: colonias de color gris y consistencia húmeda y arrugada (Figura 1-A, B) y colonias de color blanco de consistencia algodonosa (Figura 1-C). Con el propósito de estandarizar los cultivos y determinar el punto óptimo de colecta de las proteínas secretadas, se analizó la cinética de crecimiento durante un periodo de tiempo de 76 h mediante la determinación de la absorbencia (600 nm), la integridad celular, y el proceso de crecimiento del hongo en forma de levadura o micelio.

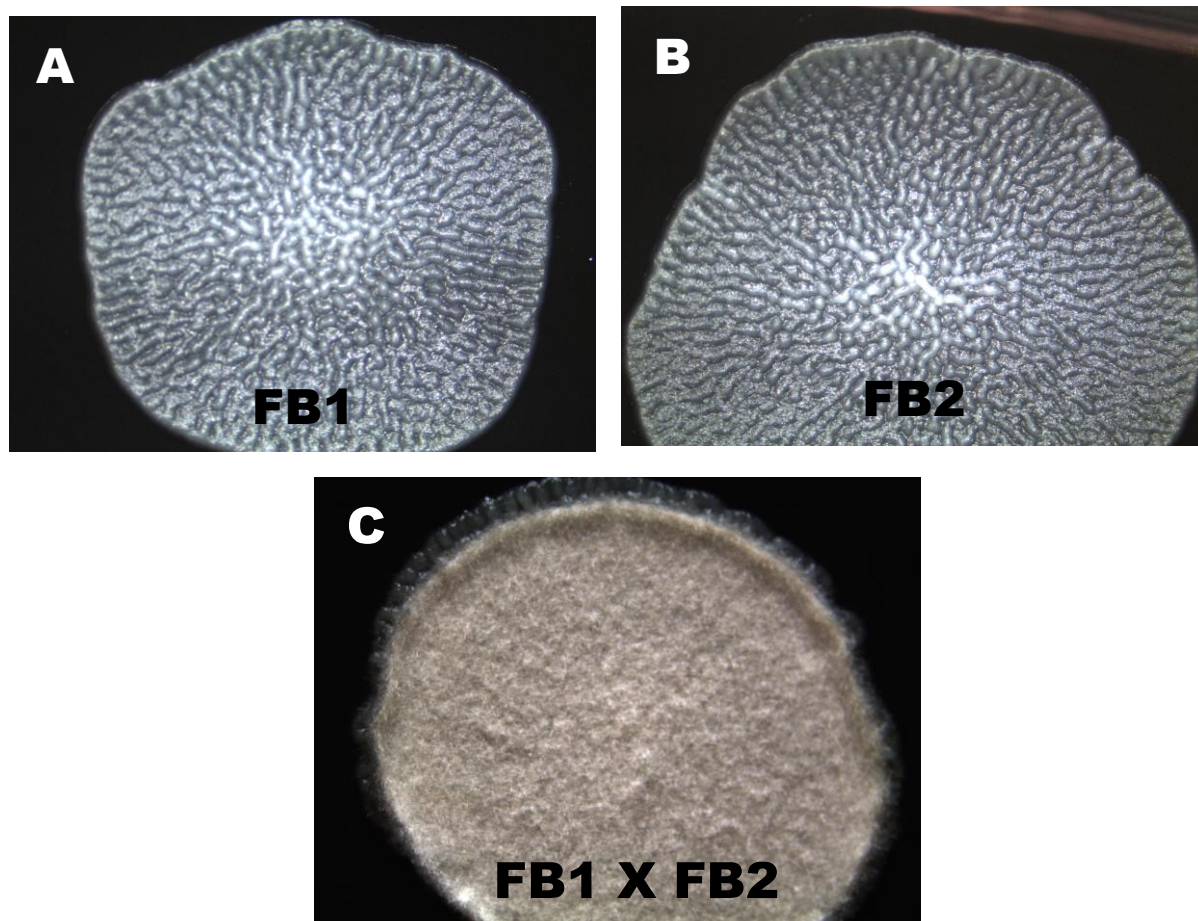


Figura 1. Resultados de la reacción de Fuzz entre la cepa FB2 (*a2b2*) y FB1 (*a1b1*) del hongo *U. maydis* cultivado en medio mínimo a pH 7 después de 20 horas de incubación. Crecimiento levaduriforme de colonias de FB1 (A) y FB2 (B). Crecimiento del micelio blanco y algodonoso desarrollado de la fusión compatible entre las cepas FB1 X FB2 (C).

La Figura 2 muestra la cinética del crecimiento de las poblaciones de *U. maydis* a uno u otro pH en donde se distinguen claramente las fases lag, crecimiento exponencial acelerado, desaceleración y estacionario. En términos generales, puede observarse que los cultivos a pH 7 alcanzaron regularmente valores de absorbencia mayores ($D.O.= 1.68 \pm 0.0127$) que los observados en los cultivos a pH 3 ($D.O.=1.16 \pm 0.0035$). Durante los cultivos, las células crecidas en el medio a pH 7 permanecieron como levaduras unicelulares dividiéndose por gemación durante todo el experimento (Figura 3-A). Se observó que el proceso dimórfico en los cultivos con pH 3 se inició a las 8 h después de la inoculación. Inicialmente estas células en proceso de diferenciación se alargan, después se dividen pero sin sufrir separación celular (se hacen

multicelulares), dando origen a los micelios jóvenes de 2, 3 ó 4 células con una morfología diferente a las levaduras (Figura 3-B). A partir de ese momento, la población estuvo mezclada con levaduras y micelios en proceso de transición dimórfica (Figura 3-C) y micelios maduros, los cuales estaban formados por 8-10 células (Figura 3-D). Al cabo de 30 h de cultivo se observó que el 100% de las células estaban diferenciadas (Figura 3-D).

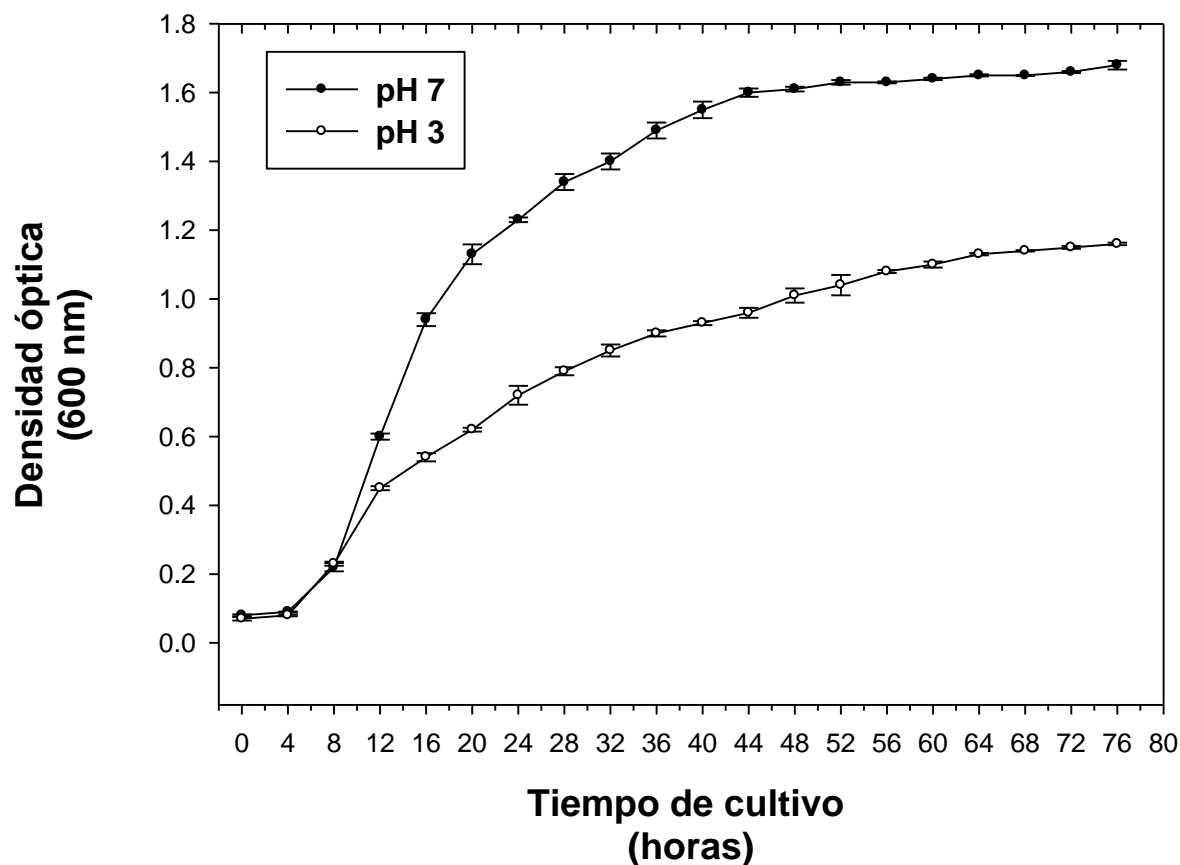


Figura 2. Curvas de crecimiento del hongo *U. maydis* cultivado en medio mínimo a diferente pH durante 76 horas de incubación.

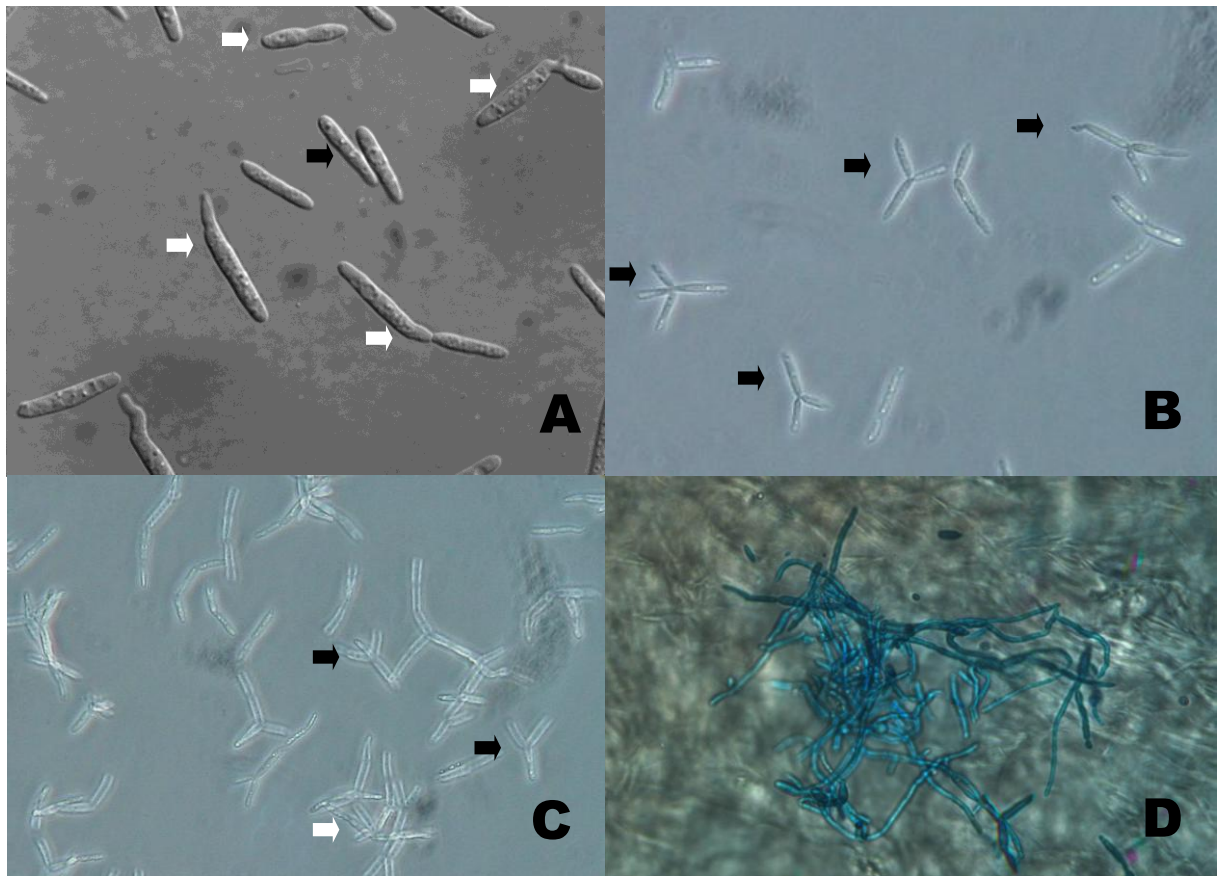


Figura 3. Morfología de hongo *U. maydis* cultivado en medio mínimo a diferente pH después 30 horas de incubación. A. Células levaduriformes unicelulares (flecha blanca) y en proceso de división (flecha negra) cultivadas a pH 7. B. Micelios jóvenes en proceso de diferenciación (flechas). C. Cultivo mezclado con células en proceso de diferenciación (flecha negra) y micelios en crecimiento (flecha blanca). D. Micelios en proceso de crecimiento y maduración.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de crecimiento y concentración de proteína obtenidos en estos experimentos, en donde se puede comprobar su reproducibilidad experimental.

Medio de Cultivo	Densidad óptica* (600 nm)	Concentración Total de la Proteína [■] (mg)
pH 7	1.246 ± 0.04	2.44 ± 0.15
pH 3	0.821 ± 0.06	1.88 ± 0.15

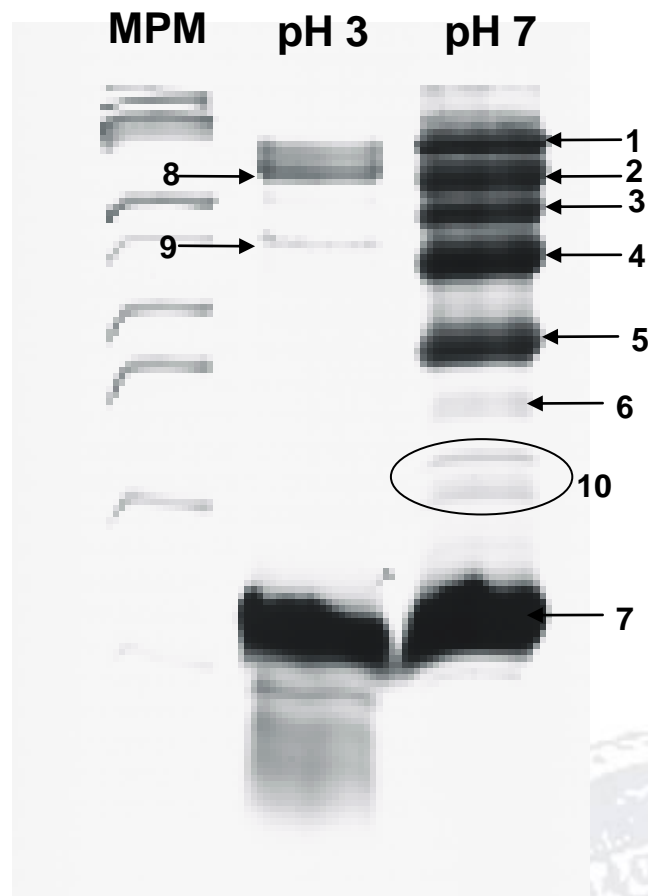
* Lecturas promedio ± error standard (n= 15).

■ Concentración ± error standard obtenidas de cultivos de 600 mL (n= 5)

Cuadro 1. Datos de absorbancia y concentración de las proteínas secretadas por el hongo *Ustilago maydis* cultivado en medio mínimo a diferentes pHs después de 30 horas de incubación.

Perfil de proteínas secretadas por U. maydis cultivado a diferentes condiciones de pH.

Resultados representativos del análisis SDS-PAGE se muestran en la Figura 4. De manera reproducible se lograron separar 10 bandas de proteína (Figura 4); de las cuales 8 correspondieron al cultivo de pH 7 y solo 2 al cultivo de pH 3. Solo 5 de las proteínas analizadas pudieron ser identificadas en 5 experimentos diferentes, pero el resto no fue posible identificarlas, porque la concentración de proteína era tan baja que no se obtuvieron resultados satisfactorios. Las proteínas identificadas pertenecen todas a las secretadas por la forma de levadura del hongo (pH 7). Las proteínas identificadas y sus valores máximos de semejanza (0.05 o menor) se describen en el Cuadro 2. Como puede observarse, todas las proteínas identificadas pertenecen efectivamente a *U. maydis*, y al menos 4 de ellas son de secreción. Sus masas teóricas oscilan entre 31 y 68 kDa, con un contenido de aminoácidos que va de 298 a 636. Estas proteínas presentan valores de punto isoeléctrico (pI) en un rango de 4.72 y 10.13 y sus genes codificantes se localizan en 5 cromosomas diferentes (2, 5, 9, 11, 22) de los 22 que posee el hongo. La actividad o función de 3 de las 5 proteínas es desconocida, una está relacionada con la spherulin 4 y la última es una GPI (glycosyl phosphatidylinositol) relacionada con la glucanasa MLG1.



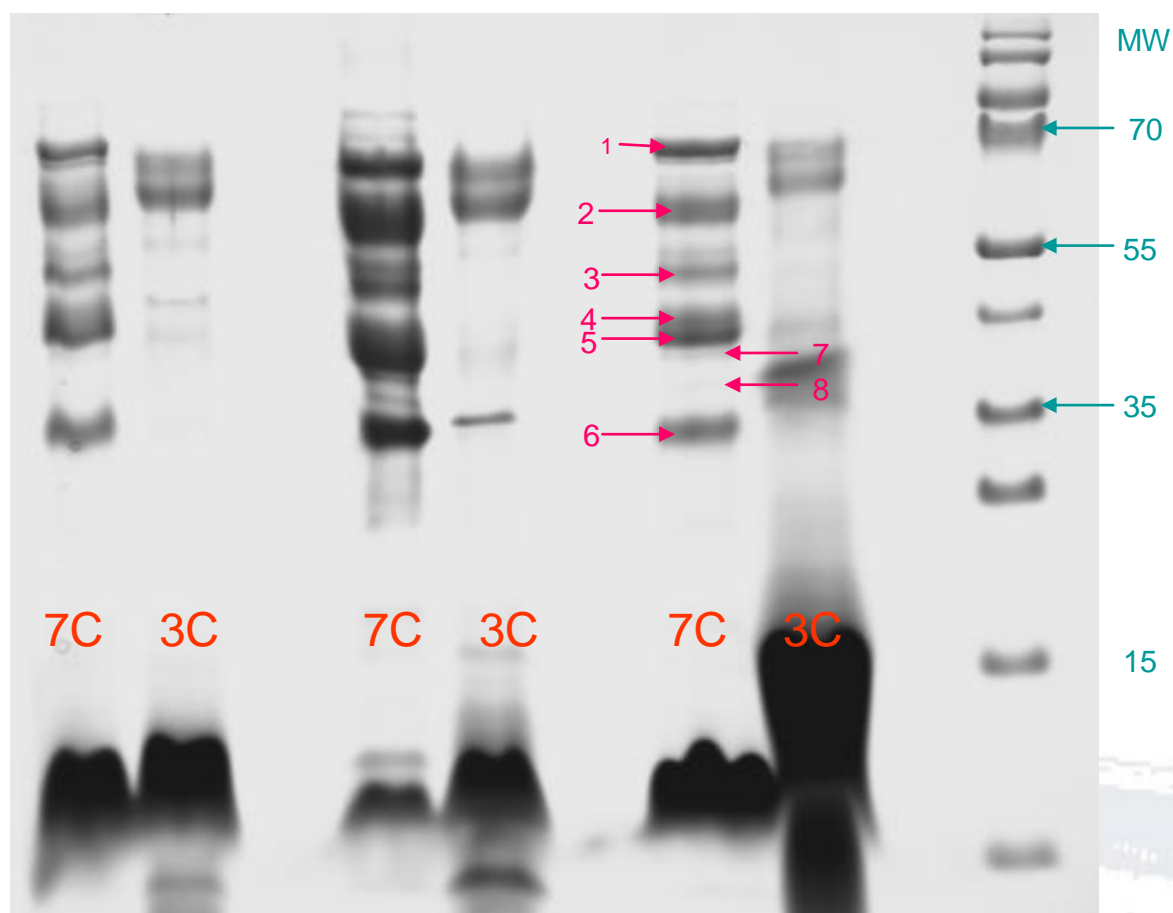


Figura 4. Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las muestras de proteínas secretadas por *U. maydis* cultivado en medio mínimo a diferente pH durante 30 horas.

Cuadro 2. Identificación de las proteínas* secretadas por *U. maydis* a pH 7.

Accesión	Identificación	Valor de SCORE y Expectancia	Cromosoma	Descripción	Localización Subcelular	Longitud Gene/Proteína (nt) (aa)		Punto Isoeléctrico Teórico	Peso Molecular Teórico (Da)
UM04044	XP_760191	1179 / 0.0	Chr11	Proteína Hipotética Relacionada con Glucosa Oxidasa	Ruta de Secreción	1911	636	8.35	68,266
UM03614	XP_759761	832 / 0.0	Chr09	Proteína Hipotética Conservada	?	1470	489	7.94	52,833.2
UM01213	XP_757360	437 / e^{-141}	Chr02	Proteína Hipotética Conservada	Ruta de Secreción	897	298	4.72	31,078
UM06157	XP_762304	600 / e^{-120}	Chr22	Relacionada con el Precursor de Spherulin 4	Ruta de Secreción	975	324	10.13	35,523
UM02134 ES GPI	XP_758281	638 / 0.0	Chr05	Relacionada con el Precursor de Glucanasa MLG1	Ruta de Secreción	1167	388	6.23	41,510.9

*Todas las proteínas se identificaron en cinco experimentos independientes

Discusión y Conclusiones

Es importante hacer notar que en este estudio se logró reproducir las condiciones necesarias para inducir el proceso dimórfico de *U. maydis* cultivado bajo condiciones *in vitro* a diferentes pHs. Las observaciones realizadas en los cultivos experimentales señalan que la inducción del crecimiento micelial se inicia a las 8 h después de la inoculación en medio de pH 3, lo cual coincide con datos obtenidos previamente (Ruíz-Herrera *et al.*, 1995) y se completa antes de las 24 h de incubación.

Se observó que el tratamiento de ayuno nutricional y choque térmico al que fueron sometidas las células del hongo resultó ser crítico para producir el cambio morfológico, el cual solamente se da cuando las condiciones de cultivo y manejo se mantienen estrictamente homogéneas, como lo

señala para *U. maydis* (Ruíz-Herrera *et al.*, 1995), para *Candida albicans* (Soll, 1985) y para *Yarrowia lipolitica* (Guevara-Olvera, 1983). Las curvas de crecimiento obtenidas luego de 76 h de cultivo (Figura 2), muestran comportamientos similares para ambas condiciones de pH, en donde se aprecian las fases típicas de poblaciones de *U. maydis* crecidas en medio líquido: lag, crecimiento exponencial acelerado, desaceleración y estacionario; sin embargo, fue evidente que el crecimiento de las levaduras fue más acelerado que el de los micelios, ya que los valores de absorbencia después de las primeras 8 h de la inoculación se dispararon en los cultivos con pH 7. Una posible explicación a esta observación es que las esporidias cultivadas a un pH de 7 sólo crecen para dividirse; sin embargo, las células crecidas en un pH de 3, además que tienen condiciones más restrictivas para la absorción de los nutrimentos del medio de cultivo, deben sufrir el proceso de diferenciación para formar los micelios. Estas condiciones podrían en consecuencia reducir el crecimiento de la población celular. Los datos obtenidos de los cultivos señalan que la fase estacionaria fue relativamente corta, ya que tuvo una duración de 4 horas en ambas condiciones de pH. La fase exponencial se extendió hasta las 28 h en los cultivos de ambos pHs y la fase de desaceleración fue relativamente prolongada, ya que tuvo una duración de 12 h (de las 32 a las 44 h de cultivo) en el medio con pH 7 y 24 horas (de las 36 a las 60 horas) en el medio con pH 3. Este comportamiento de la población celular del hongo permitió asegurar que proteínas secretadas y cosechadas a las 30 h de cultivo no son contaminante ni fueron liberadas por un proceso de lisis del organismo como podría ser el caso en cultivos viejos.

Durante el establecimiento de los cultivos experimentales, la pureza e identidad genética de la cepa experimental fue confirmada a través de la reacción tipo “Fuzz” (Martínez-Espinoza *et al.*, 1997; Ruíz-Herrera, 2008). Esta prueba es sencilla de realizar; sin embargo, el apareamiento en *U. maydis* es un fenómeno complejo controlado por los loci llamados *a* y *b*, el primero representado por dos alelos y el segundo por múltiples alelos (Rowel 1955-a y b; Holliday 1974). La prueba es contundente porque el apareamiento de las esporidias haploides con diferente loci *a* y *b* resulta en la diferenciación de la fase micelial. Los resultados obtenidos al crecer de manera aislada células de la cepa FB2 (*a2b2*) y células de FB1 (*a1b1*) resultaron en la formación de colonias de color grisáceo de consistencia húmeda y arrugada; sin embargo, cuando se mezclaron, se logró el apareamiento y la diferenciación de los micelios, formando colonias

blancas de aspecto algodonoso, lo cual esta en congruencia con lo reportado por varios autores (Rowel, 1955-a y b; Banuett y Herskowitz, 1989). Como puede observarse, en este estudio los experimentos de confirmación a través de esta prueba, el estricto control de las condiciones de cultivo, la preparación de los inóculos y la inducción de la diferenciación celular fueron fundamentales para asegurar que siempre se estuvo trabajando con el mismo organismo y con las condiciones de homogeneidad requeridas que permitieron la obtención de resultados reproducibles.

Los resultados aquí presentados son los primeros en mostrar datos del perfil de proteínas que el hongo secreta cuando es crecido en condiciones *in vitro* y sometido a un proceso de diferenciación dimórfica inducido por el cambio en las condiciones de pH del medio de cultivo. De esta manera, logramos identificar 5 proteínas de secreción exclusivas de la forma de levadura del hongo, las cuales no habían sido identificadas previamente. Esta información resulta relevante porque ofrece la oportunidad de analizar el papel de estas proteínas en el fenómeno del dimorfismo, lo cual es esencial para completar la información generada en los estudios de genómica y secuenciación publicados para este organismo (Kämper *et al.*, 2006).

Recientemente se ha publicado información sobre el secretoma de *U. maydis* proveniente de estudios *in silico* (Mueller *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2008) o del análisis de proteínas citosólicas (Böhmer *et al.*, 2007); sin embargo, no existen antecedentes experimentales como el aquí reportado que avalen los datos publicados. En los estudios a los que se hace referencia se señalan algunas proteínas relacionadas con la secreción del hongo como Hidrofobina (*HUM2*), una proteína repelente (*REPI*) (Teertstra *et al.*, 2006; Wösten, 2001), otra proteína de la clase repelente (*Rsp2*), algunos homólogos de la manoproteína MP88, así como varias proteínas de la pared con dominios de expansión y fosfolipasas, proteínas hidrolíticas y varias enzimas desconocidas (Müller *et al.*, 2008). Böhmer *et al.* (2007) reportaron 13 proteínas relacionadas con el crecimiento y transición dimórfica del hongo, incluyendo una proteína disulfide-isomerasa, una aldo-keto reductasa y SEP 3, así como glutaminasa A, UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, 1, 4-benzoquinona reductasa y algunos homólogos de Cdc48 y Pep4. En nuestro

estudio, cuatro de las 5 proteínas identificadas están relacionadas con el metabolismo de secreción de *U. maydis*, lo cual confirma que las proteínas analizadas eran de secreción. Tres de las 5 proteínas tienen una función desconocida, sin embargo, una está relacionada con el Precursor Spherulin 4 y la otra parece ser una GPI relacionada con el Precursor Mixed-Linked MLG1 Glucanasa. La Spherulin es un antígeno producido por el hongo *Coccidioides immitis* durante su estadio de endospora y es usado en la medicina de manera similar a la coccidioidina para contrarrestar la coccidiomicosis (Merrian-Webster On Line. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/spherulin>; Stevens *et al.*, 1975). Actualmente no se tiene conocimiento de la síntesis y secreción de antígenos en *U. maydis*; sin embargo, ésta podría ser factible si se considera que ambos organismos son hongos, aunque la diferencia que salta a la vista es que *C. Immitis* lo sintetiza cuando es una endospora y *U. maydis* en su fase de levadura.

Las proteínas GPIs en particular, son sintetizadas por organismos eucariotes (incluyendo desde protozoarios, hongos hasta mamíferos) y están ancladas a membranas por medio de enlaces covalentes a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Estas proteínas no tienen un dominio transmembranal ni una cola citoplásmica y se encuentran localizadas exclusivamente en la región extracelular de la membrana plasmática. Estas proteínas forman una familia de moléculas diversas asociadas con enzimas, moléculas de adhesión, activación de antígenos, marcadores de diferenciación, etc. (Brown y Waneck, 1992). Todas las GPIs poseen una estructura común caracterizada por una sub-estructura tipo Man (α1-4) GlcN (α1-6) myo-inositol-1P-lipid. La biosíntesis de las GPI incluye tres fases: (i) La síntesis de un precursor en la membrana del retículo endoplásmico, (ii) La unión de la proteína al sitio C-terminal de la nueva proteína sintetizada en el lumen del retículo endoplásmico, y (iii) remodelación de la cadena de lípidos y/o carbohidratos en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Ruíz-Herrera *et al.* (2008) reportan en un estudio llevado a cabo bajo condiciones *in silico* una lista de proteínas GPI involucradas con la síntesis de la pared celular de este hongo.

En resumen, con la presente investigación se establecieron las bases técnicas para continuar con estudios mas detalladas usando electroforesis de doble dimensión. También se generó un perfil de

Identificación de las proteínas secretadas por el hongo *Ustilago maydis* (DeCandole) Corda (Basidiomiceto) cultivado en *in vitro*

en el que se identificaron 5 proteínas que no habían sido reportadas previamente, las cuales son exclusivas de la forma de levadura de *U. maydis*.

Agradecimientos

A la Universidad De La Salle Bajío por el apoyo económico recibido a través de la Convocatoria 2007 de Proyectos de Investigación para Profesores en Formación. Los autores agradecen la amabilidad de la Dra. Flora Banuett (University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA) por poner a nuestra disposición la cepa experimental FB2. Los autores agradecen a María del Rosario Sánchez González (estudiante del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato) su participación en las etapas iniciales de esta investigación.

Referencias

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- 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 Reviews Genetics 29: 179-208.
- Banuett, F. and I. Herkowitz. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Proceedings of the National Academy of Science 86: 5878-5882.

- Banuett, F. and I. Herkowitz. (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Exp. Mycol.* 18: 247-266.
- Böhmer, M.; T. Colby; C. Böhmer; A. Bräutigam; J. Schmidt, and M. Bölker. (2007). Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7: 675–685.
- Bölke, M. (2001). *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.
- Bölker, M.; C.W. Basse, and J. Schirawski. (2008). *Ustilago maydis* secondary metabolism—From genetics to biochemistry. *Fungal Genetics and Biology* 45: S88-S93.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Brown, D. and G.L. Waneck. (1992). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J Am Soc Nephrol* 3: 895-906.
- Guevara-Olvera, L.; C. Calvo-Méndez, and J. Ruíz-Herrera. (1993). The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 485-493.
- Haskins, R.H. and J.A. Thorn. (1951). Biochemistry of the ustilaginales. II Antibiotic activity of ustilagic acid. *Canadian Journal of Botany* 18C: 585-592.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. In: King RC (ed) *Handbook of Genetics*. Vol 1. New York: Plenum Press, pp 575–595.
- Holliday, R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst.)*. 3: 671-682.

- Immer, F.R. and J.J. Christensen. (1928). Determination of losses due to smut infections in selfed lines of corn. *Phytopathology* 18: 599-602.
- Immer, F.R. and J.J. Christensen. (1931). Further studies on reaction of corn to smut on yield. *Phytopathology* 21: 661-674.
- Kahmann, R. and J. Kämper. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* 164: 31-42.
- Kämper, J.; R. Kahmann; M. Bölker; L.-J. Ma; T. Brefort; B.J. Saville; F. Banuett; J.W. Kronstad; S.E. Gold; O. Müller; M.H. Perlin; H.A.B. Wösten; R. de Vries; J. Ruíz-Herrera; C.G. Reynaga-Peña; K. Snetselaar; M. McCann; J. Pérez-Martín; M. Feldbrügge; C.W. Basse; G. Steinberg; J.I. Ibeas; W. Holloman; P. Guzmán; M. Farman; J.E. Stajich; R. Sentandreu; J.M. González-Prieto; J.C. Kennell; L. Molina; J. Schirawski; A. Mendoza-Mendoza; D. Greilinger; K. Munich; N. Rössel; M. Scherer; M. Vranes; O. Ladendorf; V. Vincon; U. Fuchs; B. Sandrock; S. Meng; E.C.H. Ho; M.J. Cahill; K.J. Boyce; J. Klose; S.J. Klosterman; H.J. Deelstra; L. Ortiz-Castellanos; W. Li; P. Sánchez-Alonso; P.H. Schreier; I. Häuser-Hahn; M. Vaupel; E. Koopmann; G. Friedrich; H. Voss; T. Schlüter; J. Margolis; D. Platt; C. Swimmer; A. Gnirke; F. Chen; V. Vysotskaia; G. Mannhaupt; U. Güldener; M. Münsterkötter; D. Haase; M. Oesterheld; H.-W. Mewes; E.W. Mauceli; D. DeCaprio; C.M. Wade; J. Butler; S. Young; D.B. Jaffe; S. Calvo; C. Nusbaum; J. Galagan, and B.W. Birren. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 44: 97-101.
- Klosterman, S.J. (2007). Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics* 57: 1-24.

- Klosterman, S.J.; M.H. Perlin; M. García-Pedrejas; S.F. Covert, and S.E. Gold. (2007). Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics* 57: 1-47.
- Kurtz, W.G. and L.E. Ericson. (1962). Microbial production of amino acids. II. The influence of carbon and nitrogen sources and metal ions on growth of *Ustilago maydis* (DC.) Cda. and on lysine and threonine production. *Biotechnol. Bioeng.* 4: 37-52.
- Martínez-Espinoza, A.D.; M.D. García-Pedrejas, and S.E. Gold. (2002). The Ustilaginales as Plant pests and Model Systems. *Fungal Genetics and Biology* 35: 1-20.
- Martínez-Espinoza, A.D.; C. León; G. Elizarraraz, and J. Ruiz-Herrera. (1997). Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 87:259–265.
- Merriam-Webster On Line. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/spherulin>.
- Mueller, O.; R. Kahman; G. Aguilar; B. Trejo-Aguilar, and A. Wu. (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* 45: S63-S70.
- Müller, O.; P.H. Schreier, and J.F. Uhrig. (2008). Identification and characterization of secreted and patogénesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* 279: 27-39.
- Rowell, J.D. (1955-a). Functional role of compatibility factors and *in vitro* test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. *Phytopathology* 45: 370-374.
- Rowell, J.D. (1955-b). Segregation of sex factors in a diploid line of *Ustilago zeae* induce by α radiation. *Science* 1231: 304-306.
- Ruíz-Herrera, J. (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia* 1: 118-135.

- Ruíz-Herrera, J.; C.G. León; L. Guevara-Olvera, and A. Cáramez-Trejo. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141: 695-703.
- Ruíz-Herrera, J. and A.D. Martínez-Espinoza. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology* 1: 149-158.
- Ruíz-Herrera, J.; L. Ortiz-Castellanos; A.I. Martínez; C. León-Ramírez, and R. Sentandreu. (2008). Analysis of the proteins involved in the structure and synthesis of the cell wall of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45: S71–S76.
- Schägger, H. and G. von Jagow. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379.
- Shevchenko, A.; M. Wilm; O. Vorm, and M. Mann. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal.Chem.* 68: 850–858.
- Soll, D.R. (1985). *Candida albicans*. In: *Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans*. Szaniszlo PJ. Ed. Plenum Press. New York, USA.
- Stevens, D.A.; H.B. Levine, and D.R. Ten Eyck. (1975). Sensibilidad dérmica a diferentes dosis de esferulina y coccidioidina. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* – Julio: 48-53.
- Tjalsma, A.; J. Bolhuis; D.H. Jongbloed; S. Bron, and J.M. van Dijk. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 515–547.
- Teesstra, W.R.; H.J. Deelstra; M. Vranes; R. Lohmann; R. Kahmann; J. Kamper, and H.A. Wolsten. (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 152: 3607-3612.

Villanueva, C. (1997). “Huitlacoche” (*Ustilago maydis*) as a food in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* 10:73-81.

Villanueva Verduzco, C.; E. Sánchez Ramírez, and E. Villanueva Sánchez. 2007. El huitlacoche y su cultivo. Ed. Mundi-Prensa México, S.A. de C.V. México, D.F. 96 p.

Wösten , H.A.B. 2001. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 625-646.

Yonghyun, K.; M.P. Nandakumar, and M.R. Marten. 2007. Proteomics of filamentous fungi. *TRENDS in Biotechnology*, 25: 395-400.

