

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**‘ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
Ustilago maydis EN LA REPÚBLICA MEXICANA’**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:
MARÍA FERNANDA JIMÉNEZ BECERRIL**

**DIRECTORES DE TESIS:
DR. JUAN MANUEL GONZÁLEZ PRIETO
DRA. MARÍA MYRNA SOLÍS OBA.**

Reynosa, Tamaulipas.

Noviembre, 2016.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 7 del mes Noviembre del año 2016, la que suscribe María Fernanda Jiménez Becerril alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A110574 adscrita a Centro de Biotecnología Genómica manifiesta, que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dr. Juan Manuel González Prieto, Dra. María Myrna Solís Oba y cede los derechos del trabajo titulado “Análisis de la diversidad genética de *Ustilago maydis* en la república Mexicana” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Fernanda Jiménez Becerril



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 7 del mes de Noviembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:

"Análisis de la diversidad genética de *Ustilago maydis* en la república Mexicana"

Presentada por el alumno:

Jiménez
Apellido paterno

Becerril
Apellido materno

María Fernanda
Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 1 | 1 | 0 | 5 | 7 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Juan Manuel González Prieto

Dra. María Myrna Solís Oba

Dr. Raymundo Rosas Quijano

Dr. José Luis Hernández Mendoza

Dr. Xianwu Guo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Miguel Ángel Reyes López



AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, y a toda su gente (intendentes, secretarías, ingenieros, técnicos, jardineros e investigadores), gracias por abrirme las puertas al mundo de la ciencia, pero sobre todo por ser un segundo hogar durante toda mi etapa doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número de registro A110574, por apoyar la ciencia y tecnología para un mejor futuro de México.

Al Plan Institucional de Fomento a la Educación del IPN por la beca otorgada.

A mi director: Dr. Juan Manuel González Prieto por todo el apoyo brindado, por todas sus enseñanzas y sugerencias que se que a donde quiera que vaya las tendré presentes.

A mi directora: Dra. María Myrna Solís Oba por su apoyo en todo momento, por todas sus observaciones y sugerencias, pero sobre todo por todas sus enseñanzas.

A mis amigos y compadres: Dr. Netzahualcoyotl Mayek Perez y M.C. Sanjuana Hernández, por todo su apoyo, sugerencias y enseñanzas en el laboratorio.

A mi amiga: Magdis, por todo su apoyo y amistad incondicional.

A mi amigo: Dr. Régulo Ruíz Salazar, por todos sus conocimientos compartidos, y su siempre apoyo en el laboratorio.

A mi comité tutorial: Dr. Raymundo Rosas Quijano, Dr. José Luis Hernández Mendoza, Dr. Victor Ricardo Moreno, Dr. Xianwo Guo por todas las sugerencias y observaciones siempre acertadas con el único objetivo de mejorar la investigación.

Al pueblo de México: porque gracias a sus impuestos fue posible concluir la presente tesis doctoral.

A ti: espero que esta tesis te pueda ser de utilidad ó apoyo en algún aspecto de tu investigación.

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis con mucho cariño a Dios y a toda mi familia.

A mi esposo Azael: por todo tu infinito e incondicional apoyo, gracias por estar conmigo en todo momento. (Te amo).

A mis amados hijos Darío y Romina: por ser las personitas más importantes en mi vida y por impulsarme a ser mejor persona día con día.

A mis papás José y Ma. Eugenia: por su buen ejemplo, apoyo y amor infinito

A mi padre y abuelo Darío: por todo su amor, apoyo y motivación.

A mis guapos hermanos Oliver, Ramón y Michel: por su amor y cariño.

A mis tíos Víctor y Gabby: por todo su apoyo y cariño.

A todos los estudiantes que han pasado por mi entrañable Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por todas sus enseñanzas, pero sobre todo por hacer amena y divertida mi estancia doctoral.

| ÍNDICE DE CONTENIDO | Pág. |
|--|--------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | i |
| INDICE DE CUADROS..... | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| RESUMEN..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| I INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II ANTECEDENTES..... | 2 |
| 2.1 Generalidades de <i>Ustilago maydis</i> | 2 |
| 2.1.1 Ciclo biológico de <i>Ustilago maydis</i> | 2 |
| 2.2 Control de apareamiento y patogénesis del locus <i>a</i> y <i>b</i> | 3 |
| 2.2.1 Organización y estructura del locus <i>a</i> y <i>b</i> | 4-5 |
| 2.3 Diversidad genética..... | 6 |
| 2.4 Marcadores moleculares..... | 6-7 |
| 2.4.1 Marcadores moleculares SSR..... | 7-8 |
| 2.5 Empleo de marcadores moleculares en <i>U. maydis</i> | 8 |
| 2.5.1 Análisis moleculares sobre la diversidad genética de <i>U. maydis</i> a nivel de DNA genómico..... | 8-9 |
| 2.5.2 Análisis de SSR en <i>U. maydis</i> | 9 |
| 2.5.3 Análisis moleculares del locus <i>b</i> en <i>U. maydis</i> | 10 |
| 2.6 El huitlacoche..... | 10-11 |
| 2.6.1 Metodologías empleadas en la inducción del huitlacoche..... | 11 |
| III JUSTIFICACIÓN..... | 12 |
| IV OBJETIVOS..... | 13 |
| 4.1 Objetivo General..... | 13 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 13 |
| V HIPÓTESIS..... | 14 |
| VI MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 6.1 Obtención de tumores de <i>U. maydis</i> en diferentes localidades de la República Mexicana..... | 15 |
| 6.1.1 Obtención y purificación de teliosporas a partir de tumores..... | 15 |
| 6.1.2 Germinación de teliosporas a partir de tumores..... | 15 |
| 6.1.3 Obtención de DNA genómico a partir de tumores..... | 15-16 |
| 6.2 Identificación de SSR mitocondriales <i>in silico</i> | 16 |
| 6.3 Identificación de SSR a nivel nuclear..... | 16 |

| | |
|---|-------|
| 6.4 Secuenciación nucleotídica de los SSR..... | 17 |
| 6.4.1 Purificación de la reacción de secuenciación..... | 18 |
| 6.5 Amplificación de los SSR por PCR..... | 18 |
| 6.6 Técnica SSR..... | 18-19 |
| 6.7 Análisis de diversidad genética..... | 19 |
| 6.7.1 Análisis de estructura poblacional..... | 20 |
| 6.8 Prueba de Mantel..... | 20 |
| 6.9 Identificación del tipo de apareamiento de <i>U. maydis</i> | 20-21 |
| 6.9.1 Amplificación del locus de tipo del apareamiento de <i>U. maydis</i> | 21 |
| 6.9.2 Análisis Bioinformático de las secuencias del locus b de <i>U. maydis</i> | 22 |
| 6.10 Ensayos de patogénesis de <i>U. maydis</i> | 22 |
| 6.10.1 Ensayos en invernadero..... | 22-23 |
| 6.10.2 Ensayos en campo..... | 23-24 |
| 6.10.3 Análisis estadísticos de los experimentos de patogénesis en <i>U. maydis</i> | 24 |
| VII RESULTADOS | 25 |
| 7.1 Sitios de colecta de tumores de <i>U. maydis</i> en la República Mexicana..... | 25 |
| 7.2 Obtención y germinación de teliosporas a partir de tumores..... | 29 |
| 7.3 Obtención de DNA genómico a partir de levaduras..... | 29 |
| 7.4 Análisis de SSR mitocondriales en <i>U. maydis</i> | 30 |
| 7.4.1 Aislamientos de <i>U. maydis</i> empleados en el análisis de los SSRmt..... | 30 |
| 7.4.2 Identificación de SSR mitocondriales <i>in silico</i> | 32 |
| 7.4.3 Amplificación de los SSRmt..... | 33 |
| 7.4.4 Análisis de diversidad genética mitocondrial..... | 35 |
| 7.4.5 Análisis de estructura de poblaciones a nivel mitocondrial..... | 37 |
| 7.5 Análisis de SSR mitocondriales en <i>U. maydis</i> | 38 |
| 7.5.1 Aislamientos de <i>U. maydis</i> empleados en el análisis de los SSRmt..... | 38 |
| 7.5.2 Amplificación de los SSRnu..... | 38-39 |
| 7.5.3 Análisis de diversidad genética nuclear..... | 39 |
| 7.5.4 Análisis de estructura de poblaciones a nivel nuclear..... | 45 |
| 7.5.5 Prueba de Mantel..... | 47 |
| 7.6 Determinación del tipo de apareamiento <i>a</i> y <i>b</i> mediante la reacción fuzz..... | 47 |
| 7.6.1 Amplificación del locus <i>a</i> por PCR..... | 48 |
| 7.6.2 Amplificación del locus <i>b</i> por PCR..... | 48 |
| 7.6.3 Análisis Bioinformático de las secuencias del locus b de <i>U. maydis</i> | 49 |

| | |
|--|-------|
| 7.7 Ensayos de patogénesis de <i>U. maydis</i> | 49 |
| 7.7.1 Ensayos en invernadero..... | 49 |
| 7.7.2 Ensayos en campo..... | 52-53 |
| XIII DISCUSIÓN..... | 54-62 |
| IX CONCLUSIONES..... | 63 |
| X BIBLIOGRAFÍA..... | 64-71 |
| XI ANEXOS..... | 72-84 |
| XII GLOSARIO..... | 85-86 |

ABREVIATURAS

a.a. = Aminoácidos.

a1 = locus *a1*.

a2 = locus *a2*.

AFLP= Por sus siglas en inglés Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados.

AMOVA= Por sus siglas en inglés Análisis de Varianza Molecular.

ANOVA= Análisis de Varianza.

bE = gen *bE*.

bW = gen *bW*.

DNA= Ácido desoxirribonucleico.

DNAg= Por sus siglas en inglés Acido Desoxirribonucleico genómico.

DNAmt= Por sus siglas en inglés Acido Desoxirribonucleico mitocondrial.

EST= Por sus siglas en inglés Etiquetas de Secuencia Expresada.

Fst= Por sus siglas en inglés estadístico F de Wright.

HD = Homeodominio.

He= Heterocigosidad esperada

Ho= Heterocigosidad observada

ISSR = Por sus siglas en inglés Repeticiones de Secuencias Simples Internas.

mfa = gen *mfa*.

MMR= Sistem Mismatch repair.

MPM= Marcador de peso molecular

NCBI = Centro Nacional de Información sobre Biotecnología.

PCR= Por sus siglas en inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PDA= Agar papa dextrosa.

pra = gen *pra*.

RAPD = Por sus siglas en inglés DNA Polimórfico Amplificado al Azar.

RFLP= Por sus siglas en inglés Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción.

RNAm= Por sus siglas en inglés Ácido Ribonucleico mensajero.

SDS = Dodecilsulfato Sódico.

SSR = Secuencias Simples Repetidas.

SSRcp= Por sus siglas en inglés Microsatélites cloroplásticos.

SSRnu= Por sus siglas en inglés Repeticiones de Secuencias Simples nucleares.

TBE = Tris Borato EDTA.

TE = Tris EDTA.

TRF= Tandem Repeats Finder.

TROLL= Tandem Repeat Occurrence Locator.

UPGMA = Por sus siglas en inglés Agrupamiento de Muestras no Ponderadas con Medias Aritméticas.

UTR= Por sus siglas en inglés Regiones Sin Traducir.

λ = DNA del fago lambda.

ÍNDICE DE CUADROS

Pág.

| | |
|--|--------------|
| Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de SSR. Modificado de Munckasi <i>et al.</i> , 2006..... | 17 |
| Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del locus <i>a</i> y <i>b</i> | 22 |
| Cuadro 3. Características geográficas y climáticas de los sitios de colecta de los aislamientos de <i>U. maydis</i> | 26-28 |
| Cuadro 4. Características geográficas y climáticas de los sitios de colecta de los aislamientos de <i>U. maydis</i> incluidos en el análisis de diversidad genética mitocondrial..... | 30-31 |
| Cuadro 5. Localización de SSRmt de <i>U. maydis</i> en regiones intergénicas..... | 32 |
| Cuadro 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de SSR..... | 33 |
| Cuadro 7. Características de los SSRmt identificados en <i>U. maydis</i> | 34 |
| Cuadro 8. Análisis de Varianza Molecular AMOVA..... | 35 |
| Cuadro 9. Características de los SSRnu identificados en <i>U. maydis</i> | 39 |
| Cuadro 10. Análisis de Varianza Molecular AMOVA..... | 39 |
| Cuadro 11. Estadísticos de diversidad genética en <i>U. maydis</i> estimados con base en SSR nucleares..... | 40 |
| Cuadro 12. Variantes alelicas b identificadas por estado..... | 49 |
| Cuadro 13. Resultados obtenidos de 4 tratamientos probados en invernadero con plantas de maíz..... | 51 |
| Cuadro 14. Chi cuadrada (χ^2) de los tratamientos probados en invernadero..... | 51 |
| Cuadro 15. Ensayos de patogenicidad de cepas de <i>U. maydis</i> en campo..... | 52 |
| Cuadro 16. ANOVA realizado mediante el método de Tukey..... | 53 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

| | |
|--|----|
| Figura 1. Presencia de huitlacoche en las partes aéreas de una planta de maíz, cuya característica principal es la presencia de tumores..... | 2 |
| Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>U. maydis</i> . (1) Inicia cuando dos células sexualmente compatibles se aparean, (2) formación de los tubos de conjugación, (3) conjugación de esporidias, (4) formación del dicarion que penetra e invade la planta, (5) formación de teliosporas, (6) cariogamia, (7) germinación de teliospora y formación de promicelio, (8) promicelio constituido por cuatro basidiosporas. Tomado y modificado de Ruíz (2008)..... | 3 |
| Figura 3. Interacciones entre los <i>loci</i> de apareamiento durante el desarrollo de <i>U. maydis</i> . El locus <i>a</i> bialélico codifica para una feromona y un receptor y el reconocimiento de estos desencadena la fusión celular. Después de la fusión, alelos diferentes del locus <i>b</i> inducen el desarrollo micelial y patógeno. Tomado y modificado de Bolker, (2001)..... | 4 |
| Figura 4. Organización y estructura de los alelos <i>a1</i> y <i>a2</i> del locus <i>a</i> de <i>U. maydis</i> | 5 |
| Figura 5. Organización y estructura del locus <i>b</i> multialélico de <i>U. maydis</i> . N y C región amino y carboxilo terminal respectivamente. Región variable en rojo. El homeodominio (HD) en azul. Tomado de Banuett, | 5 |
| Figura 6. Mapa de la República Mexicana que muestra la localización geográfica de los sitios de colecta de aislamientos de <i>U. maydis</i> | 25 |
| Figura 7. Esporidias de <i>U. maydis</i> en medio PDA..... | 29 |
| Figura 8. DNA genómico de <i>U. maydis</i> en gel de agarosa al 1%. MPM λ Hind III..... | 29 |
| Figura 9. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando productos de PCR correspondientes al microsatélite SSRMUM3 de <i>U. maydis</i> , tamaño de fragmento esperado 281 pb. MPM Hyperladder V..... | 33 |
| Figura 10. Dendrograma UPGMA mostrando las relaciones genéticas con base en SSRmt de los 48 aislamientos de <i>U. maydis</i> | 36 |
| Figura 11. Análisis de estructura poblacional de <i>U. maydis</i> . En donde $\Delta K=2$ es considerado el nivel más alto de estructura..... | 37 |
| Figura 12. Diagrama de barras indicando las proporciones inferidas en las poblaciones de <i>U. maydis</i> mediante el análisis bayesiano. Los números asignados a los aislamientos se indican en el Cuadro 4..... | 37 |
| Figura 13. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 6% mostrando productos de PCR correspondientes al microsatélite 1.53 de <i>U. maydis</i> . Tamaño de fragmento esperado 160 pb. MPM Hyperladder V..... | 38 |
| Figura 14. Dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de 155 aislamientos de <i>U. maydis</i> colectados en México..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 15. Acercamiento del dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de los subgrupos A1 y A2 de <i>U. maydis</i> | 42 |
| Figura 16. Acercamiento del dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de los subgrupos A3 y A4 de <i>U. maydis</i> | 43 |
| Figura 17. Acercamiento del dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de los subgrupos B1 y B2 de <i>U. maydis</i> | 44 |
| Figura 18. Análisis de estructura poblacional de <i>U. maydis</i> . $\Delta K=2$ es considerado el nivel más alto de estructura..... | 45 |
| Figura 19. Diagrama de barras indicando las proporciones inferidas en las poblaciones de <i>U. maydis</i> mediante el análisis bayesiano. Los números asignados a los aislamientos se indican en el Cuadro 3..... | 45 |
| Figura 20. Acercamiento del Diagrama de barras indicando las proporciones inferidas en las poblaciones de <i>U. maydis</i> mediante el análisis bayesiano. Los números asignados a los aislamientos se indican en el Cuadro 3..... | 46 |
| Figura 21. Modelo de regresión obtenido a partir del Test de Mantel. GGD: Distancia geográfica. GD: Distancia genética..... | 47 |
| Figura 22. Prueba de la reacción fuzz en placa. Las cepas que mostraron reacción positiva señaladas con flechas amarillas | 47 |
| Figura 23. Gel de agarosa al 1% mostrando productos de PCR correspondientes al alelo a1 y a2 de aislamientos de <i>U. maydis</i> colectados en Tlaxcala. Tamaño de fragmento esperado para el alelo a1 corresponde a 666 pb, tamaño de fragmento esperado para el alelo a2 corresponde a 333pb MPM Oxygen Ladder..... | 48 |
| Figura 24. Gel de agarosa al 1% mostrando productos de PCR correspondiente al locus b de 7 aislamientos de <i>U. maydis</i> colectados en Tlaxcala. MPM Hiperladder Vivantis..... | 48 |
| Figura 25. A, B, C, D, E y F. Escala de severidad de los síntomas otorgada en la formación de tumores en plantas de maíz. A) 1= planta sana, B) 2= presencia de antocianinas y clorosis, C) 3= tumores no visibles pero tangibles en hojas, D) 4= tumores pequeños en tallos y hojas, E) 5= tumores grandes en tallos y hojas, y F) 6= planta marchita ó muerta..... | 50 |

RESUMEN

Ustilago maydis (DC) De Candolle Corda es un hongo, comestible, basidiomiceto, dimórfico, patógeno, específico del maíz, y del teosinte, agente causal del "huitlacoche" o carbón común, cuyas características principales son el desarrollo de tumores en las partes aéreas de la planta. El hongo necesita de la planta para concluir su ciclo vital. El apareamiento y patogénesis de *U. maydis* está controlado por dos locus (a y b), el locus a controla el apareamiento y consta de dos alelos, (a_1 y a_2); el locus b controla la patogénesis y presenta 25 variantes alélicas reportadas a la fecha. Por la estrecha coevolución que ha existido entre el basidiomiceto y la planta, aunado a que México es el centro de origen, mayor distribución, domesticación y diversidad de razas de maíz, resulta interesante estudiar la diversidad genética del hongo, así como su relación del locus b con el grado de patogénesis en la planta del maíz. En México a la fecha existen escasos reportes de este tipo, es por esto que en el presente estudio, mediante marcadores moleculares microsatélites y herramientas bioinformáticas, se analizó la diversidad genética mitocondrial en 48 aislamientos de *U. maydis* colectados en 10 estados de la República Mexicana. Los programas TRF y TROLL permitieron identificar cinco microsatélites (SSRMUM1, SSRMUM2, SSRMUM3, SSRMUM4 y SSRMUM5) en regiones intergénicas del genoma mitocondrial de *U. maydis*. El SSRMUM4 fue el más polimórfico. Fueron identificados doce variantes alélicas, con una media de 2.4 alelos por locus. También la diversidad genética nuclear de 155 aislamientos de *U. maydis* fue analizada, los aislamientos fueron colectados en 14 estados de la República Mexicana, con base en los SSR amplificados mediante PCR. El AMOVA indica que la mayor diversidad en el hongo se encuentra dentro de poblaciones 83%, y entre poblaciones 17%. El estadístico $F_{ST} = 0.166$ indica que existe una diferencia genética grande en las poblaciones de *U. maydis* analizadas. Los estadísticos de diversidad tales como el número de alelos diferentes (N_a) corresponde a 3.4, la heterocigosidad observada (H_o) corresponde a 0.243, la esperada (H_e) corresponde 0.424. El dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor Joining formó dos grupos principales nombrados A y B, el primero se subdivide en A1, A2, A3 y A4, y el segundo se subdivide en B1 y B2, se observó que su agrupamiento es con base en los SSR que comparten y en algunos casos con base en características climatológicas. La estructura óptima para *U. maydis* según el análisis bayesiano y con base en el valor de ΔK es $K=2$, lo cual concuerda con el dendrograma. El test de Mantel indica que no existe

correlación genética del hongo con la geográfica, arrojando un valor de $R_{xy} = 0.033$. Mediante secuenciación automática fueron identificadas 12 variantes alélicas (*b7*, *b14*, *b15*, *b19*, *b18*, *b1*, *b17*, *b11*, *b13*, *b9*, *b18a*, y *b3*), siendo la *b7* la más frecuente. Se realizaron diferentes combinaciones de cepas sexualmente compatibles para inducir el huitlacoche, primero se probaron en invernadero y posteriormente en campo. Los resultados obtenidos en invernadero mediante la prueba de Chi cuadrada indicaron que los tratamientos probados son igual de patógenos con respecto al control positivo, el valor de tablas corresponde a 9.49. Los resultados que se obtuvieron en campo de los 8 tratamientos probados, indicaron mediante un ANOVA realizado con el método de Tukey, que en el tratamiento T5, existe diferencia significativa con respecto al control positivo T7, ya que se observó mayor patogenicidad de las cepas en las plantas de maíz del T5. Los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 son estadísticamente menos patógenos que el control positivo T7, el valor de $F_{c^{**}} = 24.600$. Los tratamientos aplicados en invernadero y en campo fueron comparados mediante un análisis de correlación el cual indicó que no existe una asociación significativa con un valor de -0.097, lo anterior indica que la patogenicidad de los tratamientos tanto en invernadero como en campo fue igual.

ABSTRACT

Ustilago maydis (DC) Candolle Corda is a fungus, edible, basidiomycete, dimorphic, pathogen-specific of maize and teosinte, causal agent "corn smut" or huitlacoche, whose main features are the development of tumors in the aerial parts plant. The fungus needs the plant to complete its life cycle. Mating and pathogenesis of *U. maydis* is controlled by two loci *a* and *b*, locus *a* controls the mating it has two alleles, (*a*₁ and *a*₂); locus *b* controls the pathogenesis and has 25 allelic variants reported. Because of the co-evolution between the basidiomycete and plant, besides Mexico is the center of origin, distribution, domestication and has a high diversity of maize races, it is interesting to study the genetic diversity of the fungus and its relationship with the locus *b* degree of pathogenesis in corn plant. There are few reports of this kind in Mexico, by this reason we proposed this study. By using molecular microsatellite markers and bioinformatics tools from mitochondrial genetic diversity, there were analyzed 47 isolates of *U. maydis* collected from 10 states of Mexico. The TRF and TROLL software helped to identify five microsatellites (SSRMUM1, SSRMUM2, SSRMUM3, SSRMUM4 and SSRMUM5) in intergenic regions of the mitochondrial genome of *U. maydis*. The SSRMUM4 was the most polymorphic. We identified 12 allelic variants, with a mean of 2.4 alleles per locus. We also analyzed the *U. maydis* nuclear genetic diversity of 155 isolates collected from 14 states of Mexico, based on SSR amplified by PCR. The AMOVA indicated that the diversity in the fungus is found within populations (83%) and between populations (17%), the statistical $F_{ST} = 0.166$ indicates a large genetic difference between the *U. maydis* populations analyzed. Statistical analysis shows that the number of different alleles corresponds to 3.4 N_a , observed heterozygosity (H_o) corresponds to 0.243, heterozygosity expected corresponds to 0.424. The dendrogram achieved by the method of Neighbor Joining formed two groups named A and B, the first is subdivided into A1, A2, A3 and A4, and the second is subdivided into B1 and B2, it was observed that their grouping is based on SSRs and some cases based on climate characteristics. The optimal structure for *U. maydis* as Bayesian analysis and based on the value of ΔK is $K = 2$, which is consistent with the dendrogram. Test of Mantel indicates no genetic correlation with geographic fungus, with a value of $R_{xy} = 0.033$. By automatic sequencing we found 11 allelic variants (*b*₇, *b*₁₄, *b*₁₅, *b*₁₉, *b*₁₈, *b*₁, *b*₁₇, *b*₁₁, *b*₁₃, *b*₉, *b*_{18a}, and *b*₃), the most frequent was *b*₇. Different combinations of sexually compatible strains were performed to induce huitlacoche, they were

tested in a greenhouse of Reynosa, and later in a field located in the state of Tlaxcala. The results obtained by Chi square test indicated that the proven treatments are just as pathogenic with respect to the positive control, the tabulated value is 9.49. The results obtained from yield test and analyzed with an ANOVA and Tukey method indicated that the treatment T5, there is a significant difference from positive control T7, since higher pathogenicity of strains was observed in corn plants. T1, T2, T3, T4 and T6 treatments are statistically less pathogenic than the positive control T7, the value of $F_{c^{**}} = 24.600$. The Treatments applied in greenhouse and field was compared using a correlation analysis which indicated that no significant association with a value of -0097, this indicates that the pathogenicity of the treatments in both greenhouse and field was the same.

I INTRODUCCIÓN

Ustilago maydis (DC) Corda es un hongo comestible, patógeno, basidiomiceto, dimórfico, y biotrófico que causa enfermedad en el cultivo de maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mays ssp parviglumis*), comúnmente conocida como “huitlacoche” o “carbón común”, cuyas características principales son el desarrollo de tumores en todas las partes aéreas de la planta (Juárez *et al.*, 2011); los síntomas de la enfermedad es la clorosis en áreas infectadas, formación de pigmentos de antocianinas, necrosis, hipertrofia e hiperplasia de órganos infectados (Ruíz-Herrera, 2008). En cuanto a su taxonomía *U. maydis* pertenece al Reino: *Fungi*, Subreino: *Eumycota*, Phylum: *Basidiomycota* Clase: *Basidiomycetes*, Subclase: *Heterobasidiomycetydae*, Orden: *Ustilaginales*, Familia: *Ustilaginaceae*, Género: *Ustilago*, Especie: *maydis*, (Ruíz-Herrera, 2008). El hongo necesita de la planta para completar su ciclo sexual. El apareamiento y patogénesis de *U. maydis* está controlado por los locus de apareamiento *a* y *b*. El locus *a* consta de dos alelos, (*a1* y *a2*); El locus *b* es multialélico y consta de veinticinco alelos a la fecha reportados (Wahl *et al.*, 2010). México es el lugar de origen, domesticación, mayor distribución y diversidad genética del maíz y por la estrecha coevolución entre el hongo y la planta, se puede suponer que en la República Mexicana también existe la mayor variabilidad genética de dicho hongo. A la fecha existen muy pocos análisis de variabilidad genética en *U. maydis*, por lo tanto, es necesario ampliar el conocimiento de esta área en el hongo, así como la relación del locus *b* de apareamiento con la patogénesis en la planta del maíz. En el presente trabajo se analizó la diversidad genética mitocondrial y nuclear mediante secuencias simples repetidas (SSR). El locus *b* de *U. maydis* se determinó mediante secuenciación. Para establecer la relación entre las variantes alélicas del tipo *b* con la patogénesis del hongo en plantas de maíz, se realizaron experimentos en invernadero y campo.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Ustilago maydis*.

Ustilago maydis es un hongo comestible, patógeno, basidiomiceto, dimórfico, y biótrofo, que causa la enfermedad del 'carbón común' en el teosintle y maíz mejor conocida como 'huitlacoche' (Beas *et al.*, 2011). El huitlacoche es una enfermedad de distribución mundial que puede causar severos daños económicos. Sin embargo en nuestro país el huitlacoche ha sido usado como alimento desde la época pre-colombina, de valor agregado puesto que un elote infectado para el agricultor tiene mayor valía en el mercado que una mazorca sana (Ruíz-Herrera, 2008). La característica principal de la enfermedad es la formación de tumores en las partes aéreas de la planta del maíz (Fig. 1), así como la clorosis en áreas infectadas, la formación de pigmentos tipo antocianinas, la hipertrofia e hiperplasia de los órganos infectados de la planta (Carreño *et al.*, 2012).



Figura 1. Presencia de huitlacoche en las partes aéreas de una planta de maíz, cuya característica principal es la presencia de tumores.

2.1.1 Ciclo biológico de *Ustilago maydis*.

Ustilago maydis requiere de uno de sus dos huéspedes naturales para completar su ciclo sexual. El hongo es considerado dimórfico porque durante su ciclo de vida presenta dos formas de crecimiento: una de levadura o basidiospora la cual es saprofítica, haploide y no patogénica, y la otra micelial, dicariótica, parasita y patogénica. Las levaduras se reproducen por gemación, las gemas se forman en la máxima curvatura de la esporidias y emiten tubos de conjugación formando un ángulo de 30-45° grados con la finalidad de aparearse. Las levaduras sexualmente compatibles dan lugar a la formación de un micelio dicariótico y patogénico, el cual continúa su crecimiento penetrando a su huésped a través de aberturas

naturales, mediante estomas ó de manera activa formando un apresorio. El hongo posteriormente invade los tejidos de la planta, causando hipertrofia e hiperplasia. El micelio se fragmenta lo que da lugar a la formación de teliosporas diploides confinadas en los tumores. Cuando el tumor se rompe y las teliosporas son liberadas al ambiente, si las condiciones son favorables, la teliospora germina y forma el basidio, y este produce basidiosporas de diferente tipo de compatibilidad sexual, y nuevamente comienza el ciclo de vida de *U. maydis* (Ruíz, 2008). (Fig. 2).

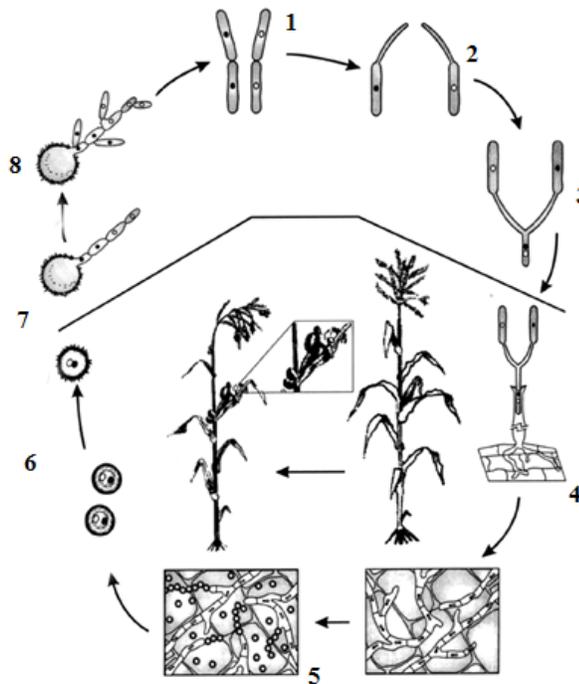


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de *U. maydis*. (1) Inicia cuando dos células sexualmente compatibles se aparean, (2) formación de los tubos de conjugación, (3) conjugación de esporidias, (4) formación del dicarion que penetra e invade la planta, (5) formación de teliosporas, (6) cariogamia, (7) germinación de teliospora y formación de promicelio, (8) promicelio constituido por cuatro basidiosporas. Tomado y modificado de Ruíz (2008).

2.2 Control de apareamiento y patogénesis del locus *a* y *b*.

La fusión celular del hongo y el subsecuente desarrollo patogénico son controlados por dos *loci* de apareamiento llamados *a* y *b* (Klosterman *et al.*, 2007). El locus *a* presenta dos alelos *a*1 y *a*2 que codifica para los componentes del sistema de reconocimiento celular, el precursor de la feromona (*mfa*) y el receptor de la feromona del sexo opuesto (*pra*), respectivamente (Klosterman *et al.*, 2007). Posteriormente, cuando la feromona reconoce el receptor de la célula opuesta es inducida la formación de tubos de conjugación y son fusionados por las puntas para dar lugar a la formación de un micelio dicariótico. Los eventos

que ocurren después de la fusión celular son controlados por el locus b. El locus b es multialélico y codifica para los genes *bE* y *bW*. Cuando provienen de células sexualmente compatibles forman un heterodímero y promueven el desarrollo micelial y patogénico (Wahl *et al.*, 2010). (Fig. 3).

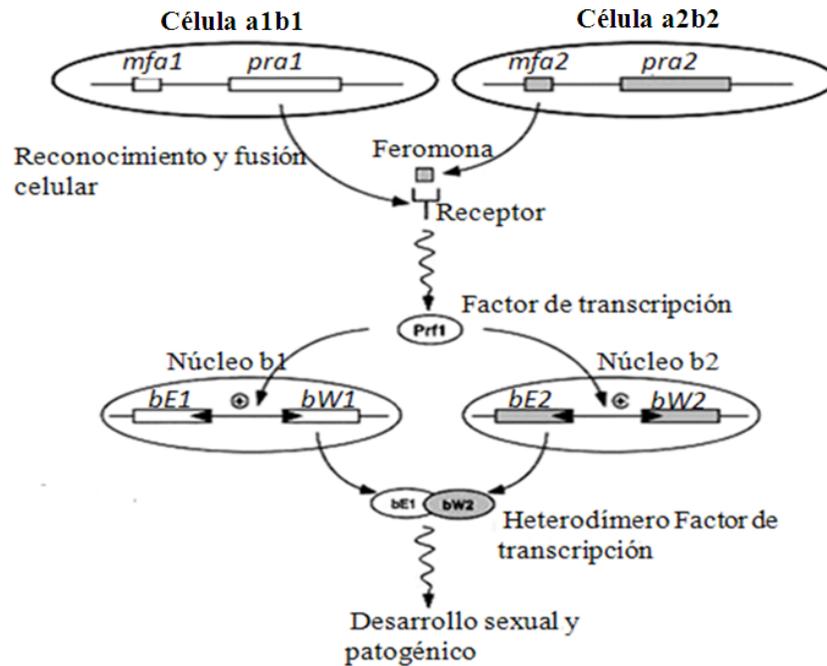


Figura 3. Interacciones entre los *loci* de apareamiento durante el desarrollo de *U. maydis*. El locus a bialélico codifica para una feromona y un receptor y el reconocimiento de estos desencadena la fusión celular. Después de la fusión, alelos diferentes del locus b inducen el desarrollo micelial y patogénico. Tomado y modificado de Bolker, (2001).

2.2.1 Organización y estructura del locus a y b.

Los alelos *a1* y *a2* son disimilares, uno de 4.0 kb y el otro de 8.5 kb respectivamente, cada alelo tiene el gen (*mfa*) que codifica para una feromona y el gen (*pra*) que codifica para un receptor, el alelo a1 tiene los genes *pra1* y *mfa1*, mientras que el alelo *a2* tiene los genes *pra2* y *mfa2* (Fig. 4).

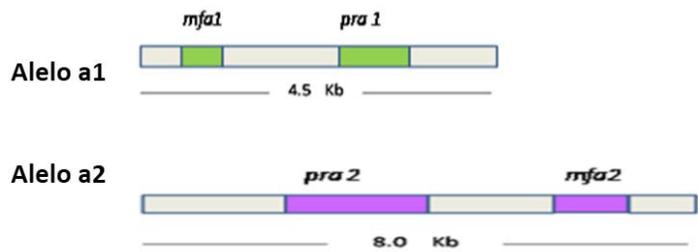


Figura 4. Organización y estructura de los alelos *a1* y *a2* del locus *a* de *U. maydis*.

El locus *b* consiste de más de 25 alelos que controlan el crecimiento filamentoso y la patogenicidad, (Banuett, 1995). De acuerdo con su estructura molecular, la organización del locus *b*, consta de dos genes divergentes, *bE* y *bW*, ambos codifican para los polipéptidos *bE* de 410 a.a. y *bW* de 626 a.a., conteniendo un motivo homeodominio (HD). Los genes *bE* y *bW* no muestran una secuencia similar pero su organización es parecida. Poseen una región variable de 120 a.a. en el extremo amino terminal para el polipéptido *bE* y una región conservada en el extremo carboxilo terminal. De igual manera el polipéptido *bW* tiene una región variable de 130 a.a. en el extremo amino terminal y una región conservada en el extremo carboxilo terminal. Entre ellos existe una región intergénica aproximadamente de 260 pb (Banuett, 1992; Banuett, 1995). (Fig. 5)

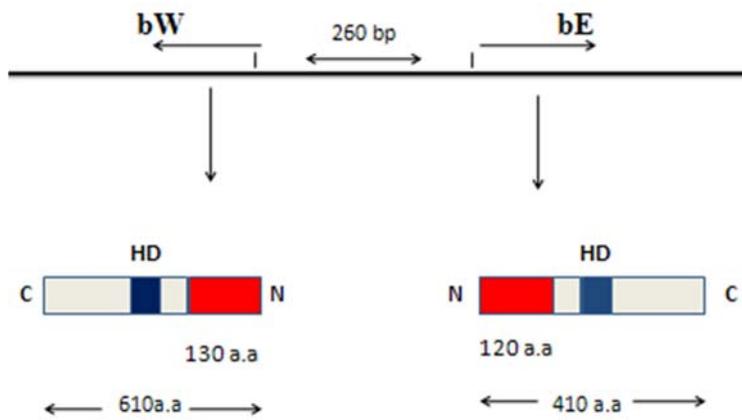


Figura 5. Organización y estructura del locus *b* multialélico de *U. maydis*. N y C región amino y carboxilo terminal respectivamente. Región variable en rojo. El homeodominio (HD) en azul. Tomado de Banuett, 1992.

2.3 Diversidad genética.

La diversidad genética se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre y dentro de los individuos de una población. Los organismos tienen la capacidad y habilidad para variar y responder a los cambios ambientales y de selección (Piñero *et al.*, 2008). En general, existen dos tipos de diversidad genética, la continua y la discontinua. La diversidad genética continua es dada cuando en una determinada especie, las diferencias entre sus individuos son graduales y provocadas por el ambiente, afectando únicamente al fenotipo, y por lo tanto no son heredables. La diversidad discontinua, es la que aparece de manera espontánea en una población, por ejemplo las mutaciones (Burd, 2009), y estas pueden ser a nivel genómico (variaciones en el número de cromosomas); a nivel cromosómico (cambios en la estructura de los cromosomas) y a nivel genético (cambios moleculares en los genes). La diversidad genética en las poblaciones se ve alterada por la reproducción sexual y asexual, por la recombinación del DNA, la selección natural, el flujo de genes, la deriva genética, entre otros factores (Piñero *et al.* 2008).

2.4 Marcadores Moleculares.

Un marcador molecular es un segmento de DNA con una ubicación física identificable en un cromosoma, cuya segregación puede ser rastreada. Un marcador puede ser un gen o un fragmento de DNA con función desconocida. A la fecha existe un gran número de marcadores moleculares tales como: marcadores basados en hibridación, por ejemplo polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción; marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por ejemplo, DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD); polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP); repeticiones de secuencias simples internas (ISSR); microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) y marcadores basados en secuencias o polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) (Aggarwal *et al.*, 2007; Sehgal y Raina, 2008). La mayoría de estos marcadores moleculares han sido desarrollados a partir de librerías de DNA genómico (RFLP ó SSR), de amplificación de PCR al azar de DNA genómico (RAPD) o ambos (AFLP) (Varshney *et al.*, 2007). En los últimos años dichos marcadores moleculares han sido utilizados para una variedad de aplicaciones por ejemplo: relaciones genéticas entre individuos, mapeo de genes útiles, construcción de

mapas de ligamiento, selección asistida por marcadores, análisis filogenéticos, estudios de diversidad genética, análisis ecológicos y estudios botánicos etc. (Agarwal *et al.*, 2008).

2.4.1 Marcadores Moleculares SSR.

Los microsatélites (SSR) se definen como repeticiones de secuencia simple de 1-6 pb distribuidos a través de todo el genoma (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Los SSR han sido detectados en todos los organismos vivos (Trivedi, 2006). Por otro lado es importante mencionar que en años recientes los SSRs han sido encontrados y caracterizados dentro de genes que codifican proteínas y en regiones sin traducir (UTRs). Dicha información es de suma importancia para desentrañar otras posibles funciones de los SSR. Actualmente el modelo más aceptado por el cual se generan las mutaciones de los SSR, es el de la cadena de síntesis de DNA durante el slippage, sin embargo, existen otros mecanismos que afectan el tamaño del repetido como la recombinación, el mal apareamiento del DNA después de la reparación (mismatch repair mechanism, MMR) y retrotransposición (Ellegren, 2004; Leclercq *et al.*, 2010; Rajwant *et al.*, 2011). Por ejemplo las expansiones y contracciones de SSR en las regiones codificadoras de proteínas pueden afectar la función, transcripción y expresión de genes, alterar funciones celulares e interrumpir el splicing RNAm etc. Todos estos efectos causados por contracciones y expansiones de los SSR dentro de genes son capaces de provocar cambios fenotípicos (Lim *et al.*, 2004). También es importante mencionar que la estructura de los SSR son funcionalmente importantes en la transcripción de genes, traducción, organización de la cromatina, recombinación, replicación del DNA, sistema mismatch repair (MMR) de DNA y ciclo celular (Li *et al.*, 2002.). A diferencia de otros marcadores (RFLP, RAPD, AFLP etc.), los SSR están considerados como una poderosa herramienta para estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994; Sunnucks, 2001), aunque también han sido empleados en estudios de paternidad, construcción de mapas de genoma de alta densidad, así como estudios para establecer relaciones genéticas y evolutivas, identificación de QTL (quantitative trait loci), estimación de relaciones genéticas (distancias genéticas) entre diferentes poblaciones (Parida *et al.*, 2009). Por lo tanto, se han convertido en una técnica estándar para la evaluación genética molecular de cualquier tipo de organismo. Todos los estudios anteriormente mencionados han sido posibles gracias a que los SSR son altamente polimórficos, son de herencia mendeliana simple, son codominantes

(pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), presentan una alta tasa mutacional, son fáciles de medir y analizar, y son cien por cien fiables, repetitivos y automatizables (Mittal y Dubey, 2009). Los SSR pueden ser desarrollados directamente de librerías de DNA genómico o de librerías enriquecidas para microsatélites específicos. Alternativamente los microsatélites pueden ser encontrados en las bases de datos como el GenBank y EMBL. Weber (1990) usó los términos “perfectos”, “imperfectos” y “microsatélites compuestos” para la clasificación de los SSR. Wang y colaboradores (2009a) clasificaron los microsatélites como “simples perfectos”, “simples imperfectos”, “perfecto compuesto” ó “imperfectos compuestos”. Hoy en día los microsatélites han sido clasificados dependiendo de su tamaño, tipo de unidad repetida y su localización en el genoma. Dependiendo del número de nucleótidos por unidad repetida, los SSR han sido clasificados como mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótidos. La mayoría de los SSR son nucleares, pero también están distribuidos en la mitocondria y cloroplasto. En años recientes los SSRcp han sido extensamente usados para estudios de variaciones genómicas en plantas y el flujo de genes en poblaciones naturales (Provan *et al.*, 2001) debido a su herencia uniparental.

2.5 Empleo de marcadores moleculares en *U. maydis*.

2.5.1 Análisis moleculares sobre la diversidad genética de *U. maydis* a nivel de DNA genómico.

Existen escasos análisis moleculares reportados con respecto a la diversidad genética de *U. maydis*. Zambino y colaboradores (1997) mediante análisis PCR-RFLP determinaron el nivel de diversidad genética dentro de las poblaciones pertenecientes a cuatro diferentes localidades de Minnesota, el cual corresponde al 93%. En México solo existe el reporte de Valverde y colaboradores (2000) sobre variabilidad genética de *U. maydis*, que mediante RFLP, analizaron 32 aislados pertenecientes a cinco estados diferentes de la República Mexicana distribuidos en el norte, centro y sur del país. Los autores reportan un alto grado de polimorfismo, la variación media dentro de las poblaciones fue del 77.46% y entre poblaciones fue del 10%. Saleh y colaboradores (2006) mediante análisis RAPD analizaron diez muestras de *U. maydis* pertenecientes a siete localidades diferentes de Egipto y reportan un polimorfismo del 67.50 % y la diversidad genética encontrada entre poblaciones fue del 85.86%. Barnes y colaboradores (2004) mediante marcadores AFLP diferenciaron

poblaciones de levaduras de *U. maydis* pertenecientes a Minnesota con respecto a la de Uruguay. Jiménez y colaboradores (2010) mediante análisis AFLP, analizaron 60 aislamientos de *U. maydis* pertenecientes a la República Mexicana y evaluaron la diversidad genética del basidiomiceto. El análisis mostró un polimorfismo del 98% y el AMOVA indicó moderada diferenciación genética entre *U. maydis*. El análisis de conglomerados con base en los datos AFLP indicó que *U. maydis* es ampliamente diverso puesto que no existe relación entre los agrupamientos con los sitios de origen del hongo.

2.5.2 Análisis de SSR en *U. maydis*.

Para evaluar la estructura genética e historia geográfica de *U. maydis* de diversas escalas espaciales, Munkacsí y colaboradores (2006) diseñaron marcadores repetidos en tándem con base en el genoma completamente secuenciado de *U. maydis*, que corresponde a 20.5Mb. Encontraron 2088 loci repetidos distribuidos a través de los 23 cromosomas. Seleccionaron 5 marcadores por cromosoma ($n = 115$), de los cuales 86 mostraron polimorfismo en las 36 muestras analizadas. Los marcadores identificados fueron separados en 2 clases: (i) menos polimórficos para evaluar diferenciación genética a través de distancias geográficas grandes y (ii) clases más polimórficas para evaluar dentro de rangos geográficos pequeños. En general concluyen que la unidad de longitud repetida no predice el número de alelos para un locus dado. Karaoglu y colaboradores (2004) analizaron la abundancia, ocurrencia, y densidad relativa de SSR en nueve genomas de diversos hongos demostrando que no existe una correlación entre la abundancia relativa y el tamaño de los genomas analizados, exceptuando el caso particular de *N. crassa*. Adicionalmente, mencionan que en la mayoría de los genomas los mono, di y trinucleótidos fueron los SSR más frecuentes en los genomas de hongos. Un estudio *in silico* realizado por Lim y colaboradores (2004) en el que analizaron 14 genomas de hongos para comparar la naturaleza y abundancia de SSR, encontraron que en la mayoría de los hongos con genomas con bajo %GC predominan los SSR con repetidos ricos en AT, y viceversa. Los SSR de un mayor tamaño fueron menos comunes en genomas pequeños. Los SSR con di y trinucleótidos fueron los más representados, y analizados a mayor detalle.

2.5.3 Análisis moleculares del locus b en *U. maydis*.

A pesar de que se estima que el locus b presenta más de 26 alelos, esta información ha sido pobremente utilizada para estudiar estas variantes. El primer análisis molecular en el locus b de *U. maydis*, fue realizado en cuatro localidades de Minnesota para determinar los niveles de diversidad poblacional de 79 aislamientos, utilizando el acoplamiento de la técnica, Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción con la PCR (RFLP-PCR). Se identificaron 18 tipos de apareamiento diferentes los cuales fueron representados en igualdad de frecuencias. El estudio de la diversidad genética mostró altos niveles dentro de poblaciones, y muy bajos niveles de diferenciación entre poblaciones con respecto a la variación en el locus b (Zambino *et al.* 1997).

Por otra parte, Jiménez y colaboradores (2010) determinaron el locus b de 173 aislados de *U. maydis*, pertenecientes a diferentes regiones de la República Mexicana, mediante la reacción fuzz y secuenciación. Los autores identificaron 11 variantes alélicas del tipo b (b1, b3, b7, b9, b13, b14, b15 b17, b18, b18a y b19), siendo el alelo b7 el más representado, mientras que los alelos b1 y b3 fueron menos frecuentes.

2.6 El huitlacoche

Huitlacoche es el nombre que reciben los tumores formados en el maíz causados por *U. maydis*. El huitlacoche aparece de manera natural en la mayoría de las regiones donde se cultiva el maíz, y puede aumentar en ambientes húmedos (72 a 80%) y templados (17 a 20 °C), y es más frecuente en áreas cálidas (26 a 34 °C) y moderadamente secas (Agrios, 2006; Aguayo *et al.*, 2016). Desde épocas prehispánicas el huitlacoche ha sido parte de la gastronomía mexicana y fue considerado como un 'manjar azteca'. Es un alimento peculiar por su sabor *sui géneris* que presenta una gran variedad de propiedades nutritivas: es rico en proteínas y a.a. (lisina), minerales (sodio, potasio, calcio), vitaminas (B2, B3, B7, y B9), fibra, carbohidratos y bajo en grasas (Paredes *et al.*, 2006). Al huitlacoche se le han atribuido propiedades medicinales, puesto que ayuda a controlar los niveles de colesterol y glucosa en la sangre, por su propiedad antioxidante, y en la actualidad se le considera como nutracéutico porque ayuda a prevenir el cáncer y la arteriosclerosis (Valdez *et al.*, 2009). El aumento en el consumo del huitlacoche en nuestro país y el extranjero, ha hecho que los agricultores pongan un especial interés en su producción masiva. Existen varias metodologías para la

producción en masa de huitlacoche, puesto que la infección natural en algunas ocasiones no presenta una alta incidencia del hongo, debido a que la aparición del hongo depende de las condiciones ambientales, la virulencia del patógeno y la susceptibilidad del hospedante (Aguayo *et al.*, 2016).

2.6.1 Metodologías empleadas en la inducción del huitlacoche.

La técnica de mezclar las esporas del hongo con la tierra antes de sembrar el maíz, tiene la desventaja de que las teliosporas dependen de las condiciones ambientales para su germinación y posterior infección del maíz, por lo que usualmente no da resultados deseados. El método de esparcir teliosporas al maíz en los estigmas (1-5 cm) en etapa de jiloteo, tiene la ventaja con respecto a la anterior de que el hongo se aplica directamente sobre el elote, sin embargo, también depende de las condiciones ambientales para el establecimiento de la infección. Esta técnica arroja resultados aceptables, pero no los suficientes como para emplearla masivamente.

Desde el siglo pasado, se han inyectado plántulas de maíz con una suspensión de esporidias de *U. maydis* sexualmente compatibles. Actualmente esta metodología ha dado los mejores resultados para la producción de huitlacoche con resultados del 50% de infección (Pataky *et al.*, 1995). Valdez y colaboradores (2009) concluyen que la técnica de inoculación por inyección es la más eficiente para la obtención masiva de huitlacoche, al reportar un promedio del 72% de mazorcas infectadas y 77% de cobertura del hongo sobre la mazorca. Es importante mencionar que a través de todos estos años, no sólo se han probado diferentes estrategias, si no también diferentes variedades de maíz. Por ejemplo, Pimentel y colaboradores (2011) sugieren que la variedad de maíz QMP tiene mayor influencia en la calidad de huitlacoche que las variedades Bengala y Tigre.

III JUSTIFICACIÓN

México es el lugar de mayor distribución, diversidad genética y domesticación del maíz, y debido a la estrecha co-evolución entre *U. maydis* y la planta, se sugiere que también exista la mayor diversidad genética de dicho patógeno. La importancia de estudiar la diversidad genética en los organismos radica en que mientras mayor sea esta, la supervivencia, la adaptación y la evolución de las especies son favorecidas. En el caso de *U. maydis*, el estudio de la diversidad genética permitirá conocer la distribución y frecuencia de las poblaciones del patógeno, establecer posibles relaciones entre el hongo a nivel genético, su reproducción ó alguna característica de interés, con la diversidad de su hospedero, las zonas biogeográficas donde habita, condiciones ambientales, entre otros. La diversidad genética puede ser estudiada desde dos perspectivas: a nivel nuclear y a nivel de organelos. En *U. maydis* no existen reportes previos en ambos enfoques, por lo que resulta interesante abordar su estudio para conocer cuál de ellos resulta más informativo.

Por otra parte es importante mencionar que hoy en día los agricultores han puesto especial interés en la producción del huitlacoche al poseer un valor agregado con respecto al elote, ya que su demanda va en aumento en nuestro país y el extranjero. Al respecto, el estudio de la variabilidad alélica del locus b de apareamiento, puede ofrecer una relación con la patogénesis del hongo, que incida en su virulencia, para la aplicación de la producción artificial ó masiva de huitlacoche en campo ó invernadero.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Determinar la diversidad genética de *Ustilago maydis* en la República Mexicana, así como la identificación de variantes alélicas y su asociación con la patogénesis en el maíz.

4.2 Objetivos específicos.

1. Analizar genéticamente aislamientos de *Ustilago maydis* en la República Mexicana mediante microsatélites mitocondriales y nucleares.
2. Determinar la distribución de las variantes alélicas del locus b de *U. maydis* en la República Mexicana.
3. Establecer la posible correlación entre variantes alélicas del locus b de *U. maydis* y la patogénesis en plantas de maíz.

V HIPÓTESIS

1. Existe diferenciación genética significativa entre aislamientos de *Ustilago maydis* dependiendo de la región geográfica de su origen.
2. Existe correlación entre las variantes alélicas del locus *b* de *U. maydis* y su patogénesis en la planta del maíz.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de tumores de *U. maydis* en diferentes localidades de la República Mexicana.

La colecta de tumores fue realizada en cultivos de maíz de la República Mexicana. Los tumores fueron retirados cuidadosamente con la mano, se guardaron y rotularon en bolsas de papel destrasa para mantenerlos secos, y después trasladarlos al laboratorio.

6.1.1 Obtención y purificación de teliosporas a partir de tumores.

Los tumores fueron macerados en un mortero con agua destilada estéril para liberar las teliosporas, después se filtraron y colectaron en tubos falcon de 50 ml. Las teliosporas fueron tratadas con una solución de sulfato de cobre al 0.5% durante una hora en agitación constante. Las teliosporas fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3500 rpm, el sobrenadante decantado, y las esporas fueron tratadas con una solución de antibióticos (20 µg/mL de gentamicina, 20 µg/mL de carbenicilina, 10 µg/mL de kanamicina y 10 µg/mL estreptomina).

6.1.2 Germinación de teliosporas a partir de tumores.

Alícuotas de 0.2 mL con 10^3 teliosporas se colocaron en cajas de petri con medio agar papa dextrosa (PDA), y se incubaron 24 h a 30 °C para su germinación. Las esporidias se aislaron en PDA, y posteriormente cultivadas por separado en medio líquido YPD durante 18 h a 30°C, para realizar la extracción de DNA genómico (DNAg). (González-Prieto *et al.*, 2004).

6.1.3 Obtención de DNA genómico a partir de tumores.

La obtención del DNAg de cada esporidia se realizó mediante el método modificado de Hoffman y Wriston (1987). El primer paso fue inocular una asada de una colonia fresca del hongo en 10 ml de medio YPD, y se incubó durante 16-18 h en agitación constante y con buena aeración. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado para obtener la masa celular, la cual se lavó con 0.5 mL de agua estéril y se transfirió a un tubo eppendorf, para centrifugar por 30 s y descartar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0.2 mL de solución

de lisis (triton X-100, 2%; SDS, 1%; NaCl, 0.1M; Tris-HCL pH8, 10 mM y EDTA, 1 mM), se añadió 0.2 mL de fenol-cloroformo (1:1) y 0.3 g de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro. El tubo se agitó en un “vortex” durante 1 min., y se dejó reposar en hielo durante 1 min (este paso se repitió 3 veces), después fueron añadidos 0.2 ml de TE 10:1 (Tris 10 mM y EDTA 1 mM) y se centrifugo durante 10 min. a 12000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se añadieron 30 µg de RNAsa. La mezcla fue incubada durante 5 min. a 37°C, y se agregaron 10 µl de acetato de amonio 4 M mas 1 mL de etanol al 100%. El tubo se mezcló por inversión y se dejó reposar 15 min. a -20 °C. Posteriormente fue centrifugado por 5 min. a 12000 rpm y el precipitado se lavó con 100 µl de etanol al 70%. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado se dejó secar a 55 °C durante dos minutos. El DNA obtenido se resuspendió en 50 µl de TE 10:1 y se almacenó a -20 °C.

6.2 Identificación de SSR mitocondriales *in silico*.

La identificación de los microsatélites mitocondriales (SSRmt) en *U. maydis*, se realizó con los programas Tandem Repeats Finder (TRF) versión 4.03 (Benson, 1999) y Tandem Repeat Occurrence Locator (TROLL) (Castelo *et al.*, 2002). La secuencia del DNA mitocondrial (DNAmt) de *U. maydis* fue obtenida de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el número de acceso [DQ157700.1](#). El análisis con el programa TRF fue realizado con los parámetros establecidos por el programa, mientras que con el programa TROLL se especificó la identificación de microsatélites con repeticiones de hasta 6 bases. Una vez identificados los microsatélites, con el programa PrimerSelect® 5.0 DNASTAR fueron diseñados oligonucleótidos específicos para delimitar y amplificar cada SSRmt identificado (Cuadro 6).

6.3 Identificación de SSR a nivel nuclear.

La identificación de los microsatélites nucleares en los aislamientos de *U. maydis*, se realizó utilizando 10 pares de oligonucleótidos específicos reportados por Munkacsi *et al.* (2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de SSR. Modificado de Munkacsi, 2006.

| Clave | Secuencia | Fragmento esperado (pb) | Th (C°) |
|-------|--|-------------------------|--------------|
| 168 | F: GCTGCTTTCTTTTCTTCACC R: GAGTCATGTGCGTTGGAAAG | 114 | 57.6 59.9 |
| 221 | F: CCGTCGTAATCGCACAGAT R: CCAGTATACCATCTTCTCATTTC | 99 | 60.2 61.2 |
| 53 | F: CCCTGTCGTACAGTCAGCTCT R: TAATCCTGTCGTGGATGGTG | 160 | 64.5 60.4 |
| 121 | F: GCAGTCGGCTAACAACTCA R: GCATCTGCGAGTAACTTAACG | 289 | 60.4 60.6 |
| 173 | F: AGTGCCTCGAACATCCTCAC R: GAGCTAGCGTGCAACAAGG | 184 | 62.4 62.3 |
| 86 | F: CGATTTCGAGACATGTATAGACACAC R: GGCTGAAAGGTGATGATTGG | 182 | 62.9 60.4 |
| 195 | F: CGAATCGCTGTGCAACAT R: CACCTTGACTTCGGTCGTC | 160 | 57.6 62.3 |
| 197 | F: CACGAATGACACCTTGCACT R: TCGTGCTTGTGACAGTCCTT | 145 | 60.4 60.4 |
| 230 | F: CTCTTCCAAGCTCGCCACT R: AGGCAGCCATTGATCTCATC | 573 | 62.3 60.4 |
| 249 | F: CAAGACTCGAAGCGACACAG R: CAAAGGCAAAGGCAGAGAAG | 106 | 62.4 60.4 |

6.4 Secuenciación nucleotídica de los SSR.

La secuenciación de los SSR fue realizada para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos empleados. La mezcla de reacción de secuenciación se realizó como lo indica el paquete Big Dye ® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Austin, Tx) USA Applied Biosystems™. La reacción consto de 5 µL de DNA como templado a una concentración de 10 ng/µL, oligonucleótidos a una concentración de 5 µM, 4 µL de buffer Big Dye v3.1 5X, 6 µL de agua milli -Q estéril, 4µL de buffer Big Dye v3.1 Ready mix, en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial 1 min a 96°C; 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50 °C y 4 min a 60°C; y finalmente se mantuvo a 4°C.

6.4.1 Purificación de la reacción de secuenciación.

Para la purificación de la reacción de secuenciación se utilizó el paquete BigDye Xterminator® Purification. De la reacción de secuenciación se tomaron 10 µL y se depositaron en un tubo junto con 45 µL de solución SAM, después se agitó vigorosamente hasta observar una mezcla homogénea, posteriormente se añadieron 10 µL de solución Xterminador. El tubo se agitó fuertemente a una temperatura de 25 °C a 1400 rpm por 30 min, después se centrifugo 2 min a 12000 rpm. El sobrenadante fue separado, y de éste se colocaron 10 µL en la placa del secuenciador automático ABI 3130.

6.5 Amplificación de los SSR por PCR.

Los SSR fueron amplificados por PCR en un termociclador 9800 fast Applied Biosystems. La mezcla de reacción fue preparada en 20 µl totales, conteniendo 50 ng de DNA genómico, 1X buffer PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.25mM de cada dNTP, 250 ng de cada oligonucleótido y 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase Promega. Las condiciones de reacción fueron 3 min de desnaturalización inicial a 94°C; 33 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50 - 55°C, 30 s a 72°C, y 5 min a 72°C para la extensión final. Los productos de PCR fueron examinados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con Syber Gold y visualizados en un fotodocumentador GelDocXR, de BIORAD.

6.6 Técnica SSR.

Los SSR amplificados fueron desnaturalizados durante 5 min a 96°C. 6 µL del producto de PCR fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1), el cual se preparó como a continuación se describe: los vidrios de 38 x 50 cm se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada; posteriormente, se limpiaron con etanol absoluto. Al vidrio sin muescas se le aplicó una mezcla de 1.425 mL de etanol absoluto, 5.5 µL de bind silano y 7.5 µL de ácido acético glacial, el exceso de la mezcla se retiró con un pañuelo kimwipes® y se dejó secar. Al vidrio con muescas se le adicionó 1.5 mL de diclorodimetilsilano en la campana de extracción, el exceso del reactivo se retiró con etanol absoluto. Posteriormente, los vidrios se empalmaron con la ayuda de separadores y se colocaron 12 pinzas de resorte para la retención de la acrilamida. El gel de acrilamida se preparó con 55 mL de acrilamida al 6 %, 440 µL de persulfato de amonio al 10 % y 44 µL

de TEMED®. La mezcla se colocó cuidadosamente con una jeringa en el espacio entre los vidrios. Finalmente, se colocó un peine de 132 dientes para formar los pozos y el gel se dejó gelificar durante 2 h. El gel se recorrió en una cámara de electroforesis BioRad (Sequi-Gen®) en amortiguador TBE 1X durante 30 min. A los SSR amplificados se les agregó 3 µL de amortiguador de carga (formamida 98 %, azul de bromofenol 0.05 %, xilen-cianol 0.05 % y EDTA 10 Mm). En cada pozo se cargaron 6 µL de cada SSR amplificado, y en cada gel se cargaron dos alícuotas (al inicio y al final) de 2 µL (80 ng) de marcador de peso molecular (DNA Hyperladder V, Bioline®). Los SSR fueron resueltos por electroforesis a 600 V durante 2 h. Finalizada la electroforesis, los vidrios fueron separados, y para la fijación del DNA el gel fue sumergido en ácido acético glacial al 10% durante 20 min, y lavado tres veces con agua destilada. El gel fue teñido con nitrato de plata utilizando el estuche SILVER SEQUENCE™ DNA Staining Reagents (Promega), lavado con agua milli-q, secado a temperatura ambiente y escaneado para su posterior análisis.

6.7 Análisis de diversidad genética.

El tamaño de los SSR fue analizado con el software Kodak Molecular Imaging®. El criterio considerado para establecer que un alelo es diferente, es la diferencia en tamaño de los alelos que correspondan a múltiplos del repetido. La diversidad genética de *U. maydis* fue analizada mediante un Análisis de Varianza Molecular AMOVA con 999 permutaciones. La determinación del nivel de diferenciación genética entre poblaciones se estableció por medio de la definición propuesta por Wright (1965), donde valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 y mayor de 0,25 indican pequeña, moderada, alta y elevada diferenciación genética, respectivamente. Los análisis de AMOVA, los estadísticos de riqueza alélica y la heterocigosidad fueron determinados con el programa GenAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2014). Con base en el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means) (Avice, 1994) usando 999 permutaciones, fue obtenido un dendrograma empleando el programa Darwin versión 5.0. (Perrier y Jacquemoud, 2006).

6.7.1 Análisis de estructura poblacional.

La estructura genética de *U. maydis* fue inferida mediante un análisis de conglomerados con enfoque bayesiano empleando el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). El modelo de mezcla (admixture) fue utilizado en el análisis. Dicho modelo permite que los individuos tengan múltiples orígenes poblacionales (calculando su proporción de pertenencia a cada grupo).

La base de datos de los SSRmt para el análisis bayesiano de *U. maydis* incluyó 47 individuos, 5 *loci*, y 10 poblaciones (asumiendo que todos los individuos de un estado, corresponden a una población). Diferentes valores de posibles grupos genéticos fueron evaluados (desde $K = 1$ hasta $K = 10$) con la finalidad de asignar los aislamientos a múltiples grupos. Diez análisis independientes fueron realizados, para cada uno se fijó un periodo de bur-in de 100,000 iteraciones seguido de 350,000 iteraciones MCMC (Monte Carlo Markov Chain). Para estimar el número de poblaciones más probable se calculó el delta K (ΔK) (Evanno *et al.*, 2005).

En el caso de los datos SSRnu, se utilizó un modelo de mezcla incluyendo 155 individuos, 10 *loci*, y 14 poblaciones (se asumió que todos los individuos de un estado, corresponden a una población). Los diferentes valores de grupos genéticos posibles fueron desde $K = 1$ hasta $K = 14$, con la finalidad de asignar los aislamientos a diferentes grupos.

Catorce análisis independientes fueron realizados, y para cada uno se fijó un periodo de bur-in de 100,000 iteraciones seguido de 350,000 iteraciones MCMC. Para estimar el número de poblaciones más probable, también se calculó el ΔK .

6.8 Prueba de Mantel.

La prueba de Mantel se realizó para conocer si existe una relación entre las distancias genéticas con las geográficas. El análisis fue realizado con 999 permutaciones con el programa GenAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006).

6.9 Identificación del tipo de apareamiento de *U. maydis*.

Para conocer las levaduras de *U. maydis* sexualmente compatibles (cepas con variantes alélicas a y b diferentes), se recurrió a la técnica reacción Fuzz descrita por Banuett (1995). Esta consistió en confrontar por pares 10 μL de 1×10^6 levaduras suspendidas en

medio YPD, en una caja petri con medio compuesto de 4% de dextrosa, 4% de peptona, 2% de extracto de levadura, 1% de carbón activado y 2.7% de agar. La presencia de una colonia blanca con aspecto algodonoso indicó crecimiento micelial del hongo y por lo tanto la Reacción Fuzz se consideró positiva. Cuando el resultado de la confrontación da origen a una colonia cremosa, lisa y levaduriforme se considera que no hubo apareamiento entre las cepas, por lo tanto se considera una reacción fuzz negativa. Como control negativo de la reacción se utilizaron cepas del mismo sexo. Las cepas que mostraron una reacción Fuzz positiva (sexualmente compatibles) fueron seleccionadas para amplificar por PCR e identificar mediante secuenciación (como se indico en el apartado 6.4) el tipo de apareamiento en el locus a y b.

6.9.1 Amplificación del locus de tipo del apareamiento de *U. maydis*.

Para la determinación del locus a de *U. maydis*, se llevó a cabo una amplificación por PCR en un termociclador BIORAD® modelo i⁺ cycler, usando 50 ng de DNA como templado, los oligonucleótidos a una concentración de 5 µM. Las condiciones de reacción fueron 1 min de desnaturalización inicial a 94°C; 23 ciclos de 45 s a 94°C, 40 s a 56 °C, 40 s a 72°C, y 5 min a 72°C para la extensión final.

Para la amplificación del locus b de *U. maydis* se diseñaron los oligonucleótidos específicos Forward 1484 y Reverse 2719 (Cuadro 2) de los genes *bE* y *bW* del locus b, con base en el alineamiento de las secuencias parciales de los alelos b disponibles en la base de datos del NCBI, realizado con el Software Seqman del paquete DNASTAR versión 6.0 (Gonzalez-Prieto, comunicación personal). El tamaño de fragmento amplificado del locus b esperado corresponde a 1.2 kb.

La mezcla de reacción contenía 50 ng de DNA genómico, 250ng de cada uno de los oligonucleótidos, deoxinucleótidos (dNTP's) en concentración de 10 mM, 1.5 µL de Cloruro de Magnesio a 50 mM, 5 µL de buffer 10X y 0.3 U de enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen®) en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de reacción fueron 3 min de desnaturalización inicial a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 56 °C, 2 min a 72°C, y 5 min a 72°C para la extensión final. Los productos de PCR fueron examinados mediante electroforésis en gel de agarosa al 1%, teñidos con Syber Gold y visualizados en un fotodocumentador GelDocXR, de BIORAD.

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del locus *a* y *b*.

| Clave | Tipo | Secuencia | Fragmento esperado | Th (°C) |
|-----------|---------|---------------------------|--------------------|---------|
| 1484 (bE) | Locus b | 5'CATAGCGTGAGCTGATGAAC 3' | 1.2 kb | 60.4 |
| 2719 (bW) | Locus b | 3'CCGCTCGACTCTGACGAC 5' | | 62.3 |
| Umpra 2S | Locus a | 5'GCCCTTGCTTTCAACAAC3' | 666 pb | 57.6 |
| Umpra 2R | Locus a | 3'AGAGAGACCAAAAGCCTC5' | | 57.6 |

6.9.2 Análisis Bioinformático de las secuencias del locus *b* de *U. maydis*.

Las secuencias nucleotídicas del locus *b* de *U. maydis* fueron editadas, cuando fue necesario, con el programa Chromas Lite versión 2.1. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas mediante la aplicación Blast de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.10 Ensayos de patogénesis de *U. maydis*.

6.10.1 Ensayos en invernadero.

Las cepas de *U. maydis* sexualmente compatibles empleadas en los ensayos de invernadero, fueron aisladas del municipio Tepetitla de Lardizabal, en el estado de Tlaxcala. La variedad de maíz utilizada fue cacahuazintle (pozolero). En el experimento se utilizaron charolas de germinación de 8x5 pocillos los cuales se llenaron con turba peat moss®. Las semillas de maíz fueron sembradas en ¼ de profundidad del pocillo. Un experimento preliminar fue realizado para evaluar dos métodos de inoculación en las plantas de maíz: denominados endógeno y exógeno; así como dos tipos de inoculos: levaduras y teliosporas. En total se probaron 18 tratamientos, un control positivo (cepas FB1 y FB2) y un control negativo (agua destilada estéril), con 25 repeticiones cada uno. Durante el experimento las plantas tuvieron riego continuo y a los 15 días fueron inoculadas. El método exógeno consistió en colocar una gota de 50 µL (1×10^7 cel/mL) de la suspensión de esporidias y/o teliosporas en el cono que forma la hoja al emerger del tallo de la planta. El método endógeno consistió en inyectar una mezcla de levaduras sexualmente compatibles (50 µL a una concentración de 1×10^7 cel/mL) con una jeringa de insulina en la parte media del tallo de la

planta. El registro de los resultados se realizó a los 15 días posteriores a la inoculación. La escala de severidad para evaluar la infección en las plantas de maíz fue: 1, corresponde a plantas sanas; 2, formación de clorosis y antocianinas; 3, formación de tumores no visibles pero tangibles; 4, formación de tumores chicos y medianos (menores de 1 cm); 5, tumores grandes (mayores a 1 cm); y 6, plantas marchitas ó muertas. Adicionalmente, se calcularon los siguientes índices: El porcentaje de incidencia se determinó cuantificando el número total de plantas infectadas sobre el total de las plantas inoculadas en cada uno de los tratamientos, expresado en porcentaje (Villanueva *et al.*, 1999). El porcentaje de formación de tumores se determinó cuantificando el número total de plantas que presentaron tumores. El porcentaje de severidad en las plantas se determinó cuantificando el número individual de plantas que presentaron la escala de severidad 2, 3, 4, 5 y 6.

Posteriormente, se realizó otro experimento en condiciones similares al anterior para evaluar la relación de los alelos del locus b en la patogénesis de *U. maydis*. En este caso se utilizaron levaduras como inóculo y el método endógeno de inoculación. Cuatro tratamientos con 50 repeticiones y sus respectivos testigos, con 25 repeticiones cada uno, fueron probados. La cantidad de inóculo empleada fue 1×10^6 cel. en 50 μ L. La evaluación de severidad de los síntomas se realizó en las condiciones como se describió anteriormente.

6.10.2 Ensayos en campo

El experimento fue establecido en el municipio de Tepetitla de Lardizábal entre las coordenadas 19.318152100 latitud y -98.237514600 longitud, a una altura de 2260 msnm. El tipo climático en la mayor parte del municipio prevalece templado subhúmedo con lluvias en verano. Igualmente la temperatura media anual máxima registrada es de 23.7 grados centígrados. Durante el año se observan variaciones en la temperatura que van desde los 1.5 grados centígrados como mínima, hasta los 26.2 grados centígrados como máxima. La precipitación promedio mínima es de 4.4 milímetros y la máxima de 132.1 milímetros. El experimento se estableció en agosto del 2013, a una temperatura registrada de 11 grados centígrados como mínima y 22 grados centígrados como máxima.

Las esporidias sexualmente compatibles se cultivaron por separado en matraces erlenmeyer en 20 mL de medio líquido YPD con ampicilina 50mg/mL, en agitación constante durante 18 h a 30 °C. Una vez que se obtuvo el preinóculo a una concentración de 10^5 esporidias/mL,

se transfirieron a matraces de 2 L para la obtención del inóculo final a una concentración de 10^6 esporidias/mL. Las esporidias fueron centrifugadas, empaquetadas y disueltas en agua destilada. La suspensión final de las esporidias sexualmente compatibles fue preparada a la concentración de 1×10^8 cel/mL.

El experimento que se llevó a cabo en campo se utilizó el híbrido AZ-60 Asgrow, y fueron evaluados 6 tratamientos de levaduras sexualmente compatibles de *U. maydis*, y dos controles, positivo (FB1 y FB2) y negativo (Agua estéril). El experimento se estableció con un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con ocho repeticiones. La aplicación del inóculo fue realizado en los estigmas (3-5 cm de longitud) del jilote con una jeringa tipo pistola Pro-Shot™, con una aguja calibre 18x1. La punción se realizó en la parte media del elote. La cantidad de inóculo por planta fue 1 mL a una concentración de 1×10^8 cel/mL. Para cada de tratamiento se utilizo una aguja diferente. El registro de la infección se realizó a las tres semanas de la inoculación. Cinco índices de severidad (ISE) en el desarrollo de los tumores en el elote fueron determinados: SEV1, SEV2, SEV3, SEV4 y SEV5, que corresponden a 0, 25, 50, 75 y 100% de cubrimiento del elote por las agallas del huitlacoche, respectivamente. Dentro de cada grupo de severidad se realizó un conteo del número de plantas infectadas. El porcentaje de incidencia (PI) se determinó cuantificando el número total de plantas infectadas sobre el total de los elotes inoculados en cada uno de los tratamientos, expresado en porcentaje (Villanueva *et al.*, 1999). La estimación del rendimiento de huitlacoche, se estimó pesando el huitlacoche sin olote y sin granos de elote. El rendimiento de huitlacoche se estimó para cada tratamiento, y también se calculó el total en los ocho tratamientos. El porcentaje de cobertura del hongo en el elote se estimó mediante una regla.

6.10.3 Análisis estadísticos de los experimentos de patogénesis en *U. maydis*.

La comparación estadística de los tratamientos en invernadero fue realizada mediante el método Ji cuadrada. El análisis de varianza para ambos experimentos se obtuvo con el método de tukey, y el análisis de correlación entre los tratamientos aplicados en invernadero y campo fueron obtenidos con el paquete estadístico InfoStat 8.0 (Di Rienzo *et al.*, 2013).

VII RESULTADOS

7.1 Sitios de colecta de tumores de *U. maydis* en la República Mexicana.

El muestreo de los tumores de *U. maydis* fue realizado en diez estados de la República Mexicana: Hidalgo, Tlaxcala, Chiapas, Guanajuato, Puebla, Tamaulipas, Jalisco, Zacatecas, Michoacán y Querétaro (Cuadro 3) (Fig. 6).

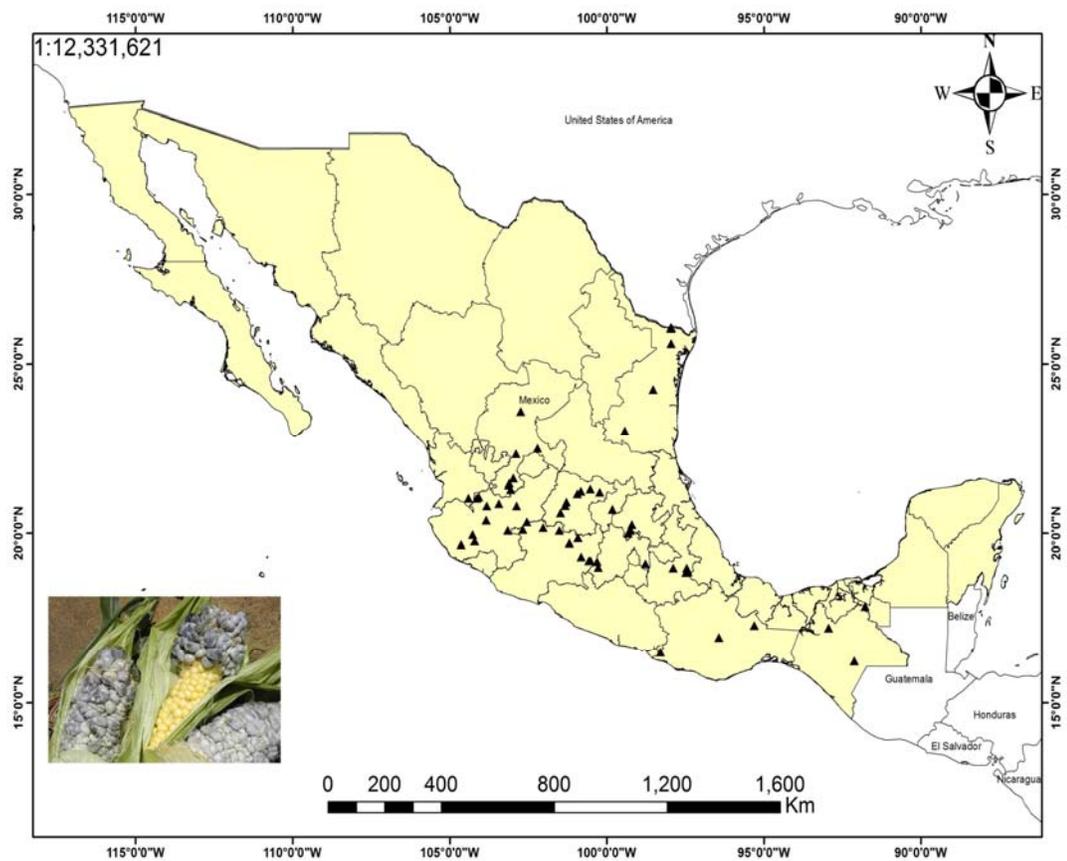


Figura 6. Mapa de la República Mexicana que muestra la localización geográfica de los sitios de colecta de aislamientos de *U. maydis*.

Cuadro 3. Características geográficas y climáticas de los sitios de colecta de los aislamientos de *U. maydis*.

| No. De aislamientos | Estados | Localidad | ID aislado | Temperatura promedio | Tipo de clima | Lat. | Long. | Alt. |
|---------------------|------------|--------------------|------------|----------------------|----------------------|-----------|-----------|------|
| 1-5 | Tamaulipas | Rio Bravo | TAMRB | >22 | Semiárido cálido | 25.60597 | -97.94532 | 139 |
| 6 | Tamaulipas | Rancho Nuevo | TAMRNV1 | >22 | Semiárido cálido | 24.25 | -98.5167 | 440 |
| 7 | Tamaulipas | Progreso | TAMPRO1 | >22 | Semiárido cálido | 26.05 | -97.952 | 150 |
| 8 | Tamaulipas | Rancho Nuevo | TAMRNV2 | >22 | Semiárido cálido | 24.25 | -98.5167 | 440 |
| 9-12 | Tamaulipas | Progreso | TAMPRO | >22 | Semiárido cálido | 26.05 | -97.95 | 150 |
| 13 | Tamaulipas | Rivera | TAMRIV | >22 | Semiárido cálido | 26.05 | -97.94 | |
| 14 | Tamaulipas | San Lorenzo | TAMSAN | >22 | Semicálido húmedo | 23.0333 | -99.4167 | |
| 15-27 | Chiapas | Chichilca Comitán | CHICHI | >18 | Semicálido subhúmedo | 16.2333 | -92.1167 | 1563 |
| 28-29 | Chiapas | Rincón Chamula | CHIRCH | >18 | Semicálido húmedo | 17.2083 | -92.9333 | 1916 |
| 30-32 | Chiapas | Chichilca | CHICHI | >18 | Semicálido subhúmedo | 16.2333 | -92.1167 | 1563 |
| 33 | Guanajuato | Temporales | GTOTEM | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.231 | -100.815 | 1798 |
| 34 | Guanajuato | Tomelópez | GTOTOM | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.6 | -101.4667 | 1710 |
| 35 | Guanajuato | La Cueva | GTOCUE | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.9167 | -101.283 | 2040 |
| 36-37 | Guanajuato | San Luis de la Paz | GTOSPZ | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.3 | - | 2100 |
| 38 | Guanajuato | Victoria | GTOVIC | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.2116 | -100.216 | 1740 |
| 39 | Guanajuato | Temporales | GTOTEM | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.231 | -100.815 | 1740 |
| 40 | Guanajuato | San Luis de la Paz | GTOSPZ | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.3 | - | 2100 |
| 41 | Guanajuato | Irapuato | GTOIRA | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.81725 | - | 1729 |
| 42 | Guanajuato | Dolores Hidalgo | GTODOL | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.156111 | -100.9325 | 1980 |
| 43 | Guanajuato | Irapuato | GTOIRA | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.81725 | - | 1729 |
| 44 | Guanajuato | Temporales | GTOTEM | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.231 | -100.815 | 1740 |
| 45 | Guanajuato | Dolores Hidalgo | GTODOL | 12 y 18 | Semiárido templado | 21.156111 | -100.9325 | 1980 |
| 46 | Guanajuato | Tomelópez | GTOTOM | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.6 | -101.4667 | 1710 |
| 47 | Hidalgo | Teocalco | HIDTEO | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.0833 | -99.2333 | 2067 |
| 48-49 | Hidalgo | Progreso | HIDPRO | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.2473 | -99.1899 | 1980 |
| 50 | Hidalgo | Teocalco | HIDTEO | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.0833 | -99.2333 | 2067 |
| 51 | Hidalgo | Progreso | HIDPRO | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.2473 | -99.1899 | 1980 |
| 52-55 | Hidalgo | Teocalco | HIDTEO | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.0833 | -99.2333 | 2067 |
| 56 | Hidalgo | Cruz Azul | HIDCRU | 12 y 18 | Semiárido templado | 19.9917 | -99.3167 | 2450 |
| 57-61 | Hidalgo | Teocalco | HIDTEO | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.0833 | -99.2333 | 2067 |
| 62 | Hidalgo | Cruz Azul | HIDCRU | 12 y 18 | Semiárido templado | 19.9917 | -99.3167 | 2450 |
| 63-64 | Oaxaca | Unión Zapata | OAXUZA | 12 y 18 | Semiárido templado | 16.93 | -96.4258 | 1640 |

| | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------------|---------|---------|----------------------|-----------|----------|------|
| 65-66 | Oaxaca | Villanueva | OAXVIL | >22 | Cálido húmedo | 17.2856 | -95.2994 | 1640 |
| 67 | Oaxaca | Unión Zapata | OAXUZA | 12 y 18 | Semiárido templado | 16.93 | -96.4258 | 1640 |
| 68 | Oaxaca | Santiago | OAXSAN | >22 | Cálido subhúmedo | 16.4944 | -98.2811 | 1740 |
| 69 | Jalisco | Paz | JALPAZ | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.3333 | -102.533 | |
| 70 | Jalisco | Saucillo | JALSAU | >18 | Semicálido subhúmedo | 21.03333 | -104.133 | 930 |
| 71 | Jalisco | Unión de Tula | JALUNI | >18 | Semicálido subhúmedo | 19.954444 | - | 1340 |
| 72 | Jalisco | Palo Chino | JALPAL | >22 | Cálido subhúmedo | 19.6667 | -104.633 | 389 |
| 73 | Jalisco | Rancho | JALRAN | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.8 | -102.867 | |
| 75 | Jalisco | El Grullo | JALGRU | >22 | Semiárido cálido | 19.7667 | -104.2 | 874 |
| 76 | Jalisco | Tequila | JALTEQ | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.8 | -103.817 | 1180 |
| 77 | Jalisco | El Grullo | JALGRU | >22 | Semiárido cálido | 19.7667 | -104.2 | 874 |
| 78 | Jalisco | Magdalena | JALMAG | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.8667 | -103.433 | 1380 |
| 79 | Jalisco | Cocula | JALCOC | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.3833 | -103.833 | 1350 |
| 80 | Jalisco | Los Cuartos | JALCUA | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 20.08 | -103.15 | 1657 |
| 81 | Jalisco | Palo Chino | JALPAL | >22 | Cálido subhúmedo | 19.6667 | -104.633 | 389 |
| 82 | Jalisco | Los Cuartos | JALCUA | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 20.0833 | -103.15 | 1657 |
| 83 | Jalisco | Hastotipaquillo | JALHAS | >18 | Semicálido subhúmedo | 21.0667 | -104.067 | 1079 |
| 84 | Jalisco | Los Cuartos | JALCUA | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 20.0833 | -103.15 | 1657 |
| 85 | Jalisco | Unión Zapata | JALUNI | >18 | Semicálido subhúmedo | 19.954444 | - | 1530 |
| 86 | Jalisco | Cocula | JALCOC | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.3833 | -103.833 | 1350 |
| 87 | Jalisco | Los Balastros | JALBAL | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.3833 | -103.832 | |
| 88 | Jalisco | San | JALSAN | >18 | Semicálido subhúmedo | 21.0333 | -104.133 | |
| 89-91 | Tlaxcala | Huamantla | TLAXTLA | | | 19.5333 | -98.2042 | |
| 93 | Nayarit | Ixtlán del Río | NAYIXT | >18 | Semicálido subhúmedo | 21.0333 | -104.4 | 1140 |
| 94 | Nayarit | Bal | NAYBAL | >18 | Semicálido subhúmedo | 21.0333 | -104.4 | 1140 |
| 95 | Nayarit | Ixtlán del Río | NAYIXT | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.3833 | -103.833 | 1140 |
| 96 | Zacatecas | Juchipila | ZACJUC | >22 | Semiárido cálido | 21.4167 | -103.117 | 1138 |
| 97 | Zacatecas | Moyahua | ZACMOY | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 21.2833 | -103.05 | 1200 |
| 98 | Zacatecas | Juchipila | ZACJUC2 | >22 | Semiárido cálido | 21.4167 | -103.117 | 1138 |
| 99 | Zacatecas | Villanueva | ZACVIL1 | 12 y 18 | Semiárido templado | 22.35 | -102.883 | 1900 |
| 100 | Zacatecas | Tepoztlán | ZACAPO1 | >18 | Semiárido semicálido | 21.4833 | -103.1 | 1700 |
| 101 | Zacatecas | Felipe Angeles | ZACFEL1 | 12 y 18 | Semiárido templado | 23.6 | -102.733 | 2110 |
| 102 | Zacatecas | Tepoztlán | ZACAPO2 | >18 | Semiárido semicálido | 21.4833 | -103.1 | 1700 |
| 103-104 | Zacatecas | | ZACOJO1 | 12 y 18 | Semiárido templado | 22.5167 | -102.2 | |
| 105 | Zacatecas | Moyahua | ZACMOY | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 21.2833 | -103.05 | 1200 |

| | | | | | | | | |
|----------------|-------------------|------------------------|----------|---------|-------------------------|-----------|-----------------------|------|
| 106-107 | Zacatecas | Jalpa | ZACJAL1 | >18 | Semiárido | 21.6333 | -102.967 | 1390 |
| 108-109 | Zacatecas | Moyahua | ZACMOY | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 21.2833 | -103.05 | 1200 |
| 110 | Zacatecas | Felipe Angeles | ZACFEL2 | 12 y 18 | Semiárido templado | 23.6 | -102.733 | 2110 |
| 111-112 | Querétaro | Cadereyta | QROCAD | 12 y 18 | Semiárido templado | 20.7 | -99.8167 | 1900 |
| 113-115 | Puebla | San Sebastián | PUESEB | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 18.9851 | -97.8755 | 1700 |
| 116 | Puebla | Serdán | PUESER1 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 18.9833 | -97.45 | 2565 |
| 117 | Puebla | Cuesta blanca | PUECTA1 | 12 y 18 | Semiárido templado | 18.8458 | -97.4722 | 2380 |
| 118 | Puebla | Serdán | PUESER2 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 18.9833 | -97.45 | 2565 |
| 119 | Puebla | San Sebastián | PUESEB4 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 18.9851 | -97.8755 | 1155 |
| 120 | Puebla | Esperanza | PUEESP | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 18.8667 | -97.4 | 2443 |
| 121 | Michoacán | Queréndaro | MICQRO1 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.8667 | -100.917 | 1845 |
| 122 | Michoacán | Plan de Gpe.Tzitzio | MICTZIO1 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.3075 | - | 775 |
| 123 | Michoacán | Purepero | MICHPUR | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.0833 | 100.81139 -101.5 | 2020 |
| 124 | Michoacán | El Órgano | MICORG1 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.2 | -100.508 | 100 |
| 125 | Michoacán | Purepero | MICPUR2 | >18 | Semicálido subhúmedo | 20.0833 | -101.5 | 2020 |
| 126 | Michoacán | Tuzantla | MICTUZ1 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.172778 | -100.567 | 600 |
| 127 | Michoacán | El Organo | MICORG2 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.2 | -100.508 | 100 |
| 128 | Michoacán | Charo | MICHA1 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.75 | -101.05 | 1900 |
| 129 | Michoacán | Jalapa | MICJAL | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 20.1667 | -102.017 | 1892 |
| 130 | Michoacán | Venustiano Carranza | MICVEN1 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 20.11194 | - | 1526 |
| 131 | Michoacán | Paso Ancho | MICPAS1 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.4958 | 102.66444 -100.917 | 971 |
| 132 | Michoacán | Venustiano Carranza | MICVEN2 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 20.111944 | - | 1526 |
| 133 | Michoacán | Plan de Gpe.Tzitzio | MICTZIO2 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.3075 | - | 775 |
| 134 | Michoacán | Paso Ancho | MICPAS2 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.4958 | 100.81139 -100.917 | 971 |
| 135-136 | Michoacán | Charo | MICCHA2 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.75 | -101.05 | 1900 |
| 137-138 | Michoacán | Queréndaro | MICQRO2 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.8667 | -100.917 | 1845 |
| 139 | Michoacán | Morelia | MICMOR1 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.7167 | -101.183 | 2400 |
| 140-141 | Michoacán | Queréndaro | MICQRO4 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.8667 | -100.917 | 1845 |
| 142 | Edo. de México | Los plátanos | EDOPLA1 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.1667 | -100.3 | 1380 |
| 143 | Edo. de México | Amecameca | EDOAME1 | 12 y 18 | Templado subhúmedo | 19.1167 | -98.7667 | 2452 |
| 144 | Edo.de México | Zuluapán | EDOZUL1 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.000 | -100.267 | 1216 |
| 145 | Edo.de México | Los plátanos | EDOPLA2 | >22 | Cálido subhúmedo | 19.1667 | -100.3 | 1380 |
| 146-148 | Edo.de México | Zuluapán | EDOZUL | >22 | Cálido subhúmedo | 19.000 | -100.267 | 1216 |
| 149-157 | Campeche | Campeche | CAMPTAB | >22 | Cálido húmedo | 17.85 | -91.7667 | |

7.2 Obtención y germinación de teliosporas a partir de tumores.

Las teliosporas germinadas se observan como colonias blancas, cremosas, de aspecto levaduriforme, y fueron aisladas mediante un palillo en otra caja de petri con medio PDA (Fig. 7).



Figura 7. Esporidias de *U. maydis* en medio PDA.

7.3 Obtención de DNA genómico a partir de levaduras.

En la Figura 8 se observa el DNA genómico e de algunos aislamientos de *U. maydis* en un gel de agarosa al 1%, usando como marcador de peso molecular el λ Hind III.

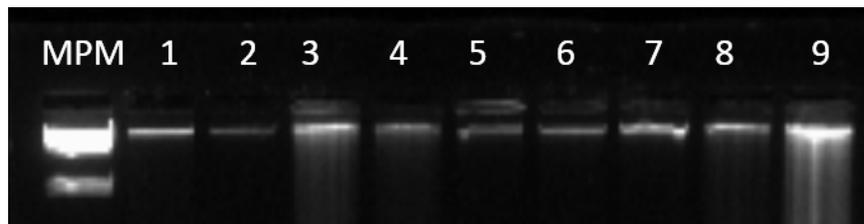


Figura 8. DNA genómico de *U. maydis* en gel de agarosa al 1%. MPM λ Hind III.

7.4 Análisis de SSR mitocondriales en *U. maydis*.

7.4.1 Aislamientos de *U. maydis* empleados en el análisis de los SSRmt.

Las características geográficas y climáticas (García, 1990) de los sitios de colecta de los aislamientos incluidos en el análisis de SSRmt se encuentran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características geográficas y climáticas de los sitios de colecta de los aislamientos de *U. maydis* incluidos en el análisis de diversidad genética mitocondrial.

| No. de aislamientos | Estados | Localidad | ID aislado | Temperatura promedio (°C) | Tipo de clima | GPS Latitud (°N) | GPS Longitud (°E) | Altitud (masl) |
|---------------------|------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| 1 | Tamaulipas | San Lorenzo | TAMSAN01 | 29 | Extremo | 23.033 | -99.416 | 40 |
| 2 | | Rancho Nuevo | TAMRNV03 | 30 | Caliente y semicálido | 24.25 | -98.516 | 440 |
| 3 | | | TAMRNV021 | | | | | |
| 4 | | | TAMRNV02 | | | | | |
| 5 | Chiapas | Chichima | CHICHI21 | 22 | Templado subhúmedo | 16.233 | -92.116 | 1563 |
| 6 | | | CHICHI07 | | | | | |
| 7 | | | CHICHI03 | | | | | |
| 8 | | Rincón Chamula | CHIRCH01 | 30 | Caliente y húmedo | 17.208 | -92.933 | 1916 |
| 9 | | | CHIRCH03 | | | | | |
| 10 | | Rivera de la Victoria | CHIRVI | 29 | Caliente y húmedo | 27.133 | -102.166 | 580 |
| 11 | Jalisco | Hostotipaquillo | JALHOS01 | 29 | Medio seco | 21.035 | -103.933 | 1079 |
| 12 | | Magdalena | JALMAG01 | 23 | Medio seco | 20.906 | -103.979 | 1380 |
| 13 | | Los cuartos | JALCUA01 | 23 | Medio seco | 21.360 | -102.24 | 1657 |
| 14 | | El grullo | JALGRU01 | 24 | Húmedo | 19.499 | -104.141 | 874 |
| 15 | | Autlán de Navarro | JALAUT02 | 30 | Medio seco | 19.766 | -104.367 | 925 |
| 16 | | | JALAUT01 | | | | | |
| 17 | | | JALAUT011 | | | | | |
| 18 | Tlaxcala | Huamantla | TLAHUA05 | 19 | Moderadamente frío | 19.311 | -97.923 | 2500 |
| 19 | | | TLAHUA04 | | | | | |
| 20 | | | TLAHUA07 | | | | | |
| 21 | Puebla | Esperanza | PUEESP01 | 21 | Semiseco-templado, subhúmedo | 18.866 | -97.4 | 2443 |
| 22 | | San Sebastián Zinacatepec | PUESEB05 | 20 | Seco y cálido | 18.333 | -97.25 | 1155 |
| 23 | Zacatecas | Juchipila | ZACJUL03 | 18 | Templado y frío | 21.19 | -103.10 | 1138 |
| 24 | | | ZACJUC03 | | | | | |
| 25 | | | ZACJAL04 | | | | | |
| 26 | | Tepetzotlán | ZACAPO03 | 20 | Templado subhúmedo | 19.718 | -99.206 | 1358 |
| 27 | | Villanueva | ZACVIL05 | 21 | Templado subhúmedo | 22.353 | -102.883 | 1900 |
| 28 | | | ZACVIL03 | | | | | |
| 29 | | | ZACVIL02 | | | | | |

| | | | | | | | | |
|----|------------|--------------------------|-----------|----|--|--------|----------|------|
| 30 | Hidalgo | Teocalco | HIDTEO12 | 17 | Templado, frío | 20.083 | -99.233 | 2067 |
| 31 | | | HIDTEO15 | | | | | |
| 32 | | | HIDTEO07 | | | | | |
| 33 | | Progreso de Obregón | HIDPRO09 | 18 | Semiseco- templado | 20.247 | -99.189 | 1980 |
| 34 | | | HIDPRO03 | | | | | |
| 35 | | | HIDPRO07 | | | | | |
| 36 | Guanajuato | Irapuato | GTOIRA02 | 18 | Templado subhúmedo | 20.683 | -101.35 | 1729 |
| 37 | | Milpillas de Santiago | GTOMIL01 | 19 | Semicaliente | 21.2 | -100.178 | 1720 |
| 38 | | | GTOMIL011 | | | | | |
| 39 | | San Luis de la Paz | GTOSPZ02 | 17 | Medioseco | 21.296 | -100.518 | 2100 |
| 40 | | | GTOSPZ03 | | | | | |
| 41 | | | GTOSPZ020 | | | | | |
| 42 | | Dolores Hidalgo | GTODOL01 | 18 | Semiarido | 21.156 | -100.93 | 1980 |
| 43 | | Temporales | GTOTEM07 | 18 | Templado subhúmedo | 21.231 | -100.815 | 1740 |
| 44 | | Hacienda de Higueras | GTOHAC02 | 19 | Templado subhúmedo | 21.097 | -101.55 | 1880 |
| 45 | Michoacán | Queréndaro | MICQRO05 | 20 | Templado | 19.482 | -100.523 | 1845 |
| 46 | | | MICQRO09 | | | | | |
| 47 | Querétaro | Cadereyta | QROCAD01 | 20 | Templado subhúmedo, seco y caliente | 20.7 | -99.816 | 1900 |
| 48 | | Camargo | QROCAM01 | | | | | |

7.4.2 Identificación de SSR mitocondriales *in silico*.

Los programas TRF y TROLL permitieron identificar 5 SSR en la secuencia mitocondrial de *U. maydis*. Los 5 SSR están localizados en regiones intergénicas, y fueron denominados SSRMUM1, SSRMUM2, SSRMUM3, SSRMUM4 y SSRMUM5, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Localización de SSRmt de *U. maydis* en regiones intergénicas.

| Nombre del gen | Productos | Posición | Referencia | ORF tamaño |
|----------------|--|-------------|------------|------------|
| <i>RNL</i> | laglidadg endonuclease | 1076-1882 | 72256230 | 806 |
| SSRMUM1 | | 4253-4292 | | |
| <i>RNI</i> | laglidadg endonuclease | 4701-4832 | 72256231 | 131 |
| <i>NAD3</i> | nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit 3 | 13190-13621 | 72256217 | 431 |
| SSRMUM2 | | 13941-13970 | | |
| <i>COX2</i> | cytochrome c oxidase subunit 2 | 15977-16744 | 72256218 | 767 |
| <i>NAD3</i> | nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit 3 | 13190-13621 | 72256217 | 431 |
| SSRMUM3 | | 15773-15842 | | |
| <i>COX2</i> | cytochrome c oxidase subunit 2 | 15977-16744 | 72256218 | 767 |
| <i>COX3</i> | cytochrome c oxidase subunit 3 | 39486-40313 | 72256224 | 827 |
| SSRMUM4 | | 40486-40313 | | |
| <i>COB</i> | apocytochrome b | 40859-43281 | 72256225 | 2422 |
| <i>NAD5</i> | NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 5 | 46103-49221 | 72256227 | 3118 |
| SSRMUM5 | | 50451-50490 | | |
| <i>ATP9</i> | ATP synthase subunit 9 | 53554-53775 | 72256228 | 221 |

7.4.3 Amplificación de los SSRmt.

A partir de los SSRmt identificados *in silico* se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificarlos en los 48 aislamientos de *U. maydis* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de SSR.

| Clave | Localización | Secuencia | Fragmento esperado (pb) | Th (C°) |
|-------|--------------|---|-------------------------|---------|
| UMF1 | Mitocondrial | F: GTTGCACTAACAATAATCCGG R: CTTTAAAGTAATTTGAGTTAGGGC | 176-190 | 53 |
| UMF2 | Mitocondrial | F: CTAATTACAGGTAATCGATAGC R: GTCATTTAGTGACTCATATCC | 176-184 | 54 |
| UMF3 | Mitocondrial | F: GAAAATTGAATATATATAATTCC R: TAATATTATAACTTGCAATTTTCC | 272-281 | 50 |
| UMF4 | Mitocondrial | F: ATTATCTTCTCCTTTATTTCTTG R: CGCTACTCTATGGTATATTAC | 152-166 | 54 |
| UMF5 | Mitocondrial | F: CTTTAATTCAAATCACTACTTCC R: CCACAGATGTTGTGATCGTG | 169-187 | 55 |

Los fragmentos amplificados por PCR que comprendían los mtSSRs variaron de 152 a 281 pb, y las longitudes de los repetidos oscilaron entre 29 y 69 pb. En la figura 9 se puede observar la amplificación del SSRMUM3.

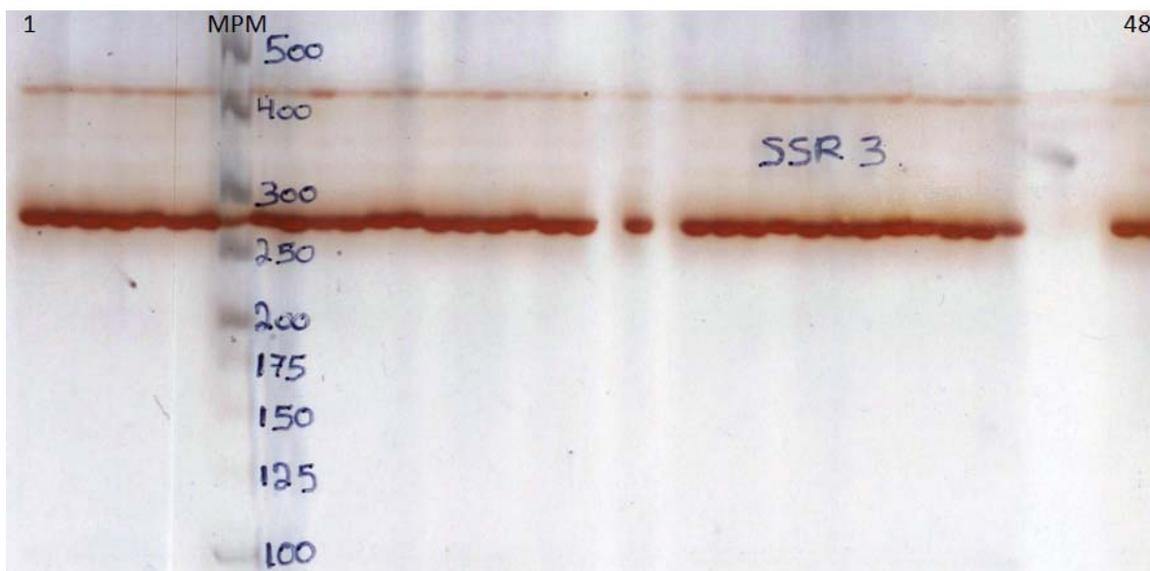


Figura 9. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando productos de PCR correspondientes al microsatélite SSRMUM3 de *U. maydis*, tamaño de fragmento esperado 281 pb. MPM Hyperladder V.

Las características de los SSR se observan en el cuadro 7. Los motivos repetidos identificados con mayor frecuencia fueron los hexanucleótidos (4), tetra (3), y deca (2); penta, hepta y octa- nucleótidos (1) fueron los menos representados. Los 12 SSR fueron clasificados por su composición como compuestos imperfectos (Wang *et al.*, 2009). Los cinco SSRmt fueron identificados en 21 aislamientos de *U. maydis*, mientras que 23 aislamientos solo presentaron los SSRMUM 2, 3, 4 y 5 (Anexo 2).

Cuadro 7. Características de los SSRmt identificados en *U. maydis*.

| Clave | Tamaño del alelo (pb) | No. De alelos | Longitud del repetido | Tipo de motivo |
|---------|-----------------------|---------------|-----------------------|---|
| SSRMUM1 | 176-190 | 2 | 39 | (AAAATAAAAT) ₂ + (ACGA) ₂ |
| SSRMUM2 | 176-184 | 1 | 29 | (TTTAAA) ₂ + (CTAGTACT) ₂ |
| SSRMUM3 | 272-281 | 2 | 69 | (AAATTA) ₃ + (TACCTATTTA) ₂ + (TTAA) ₂ |
| SSRMUM4 | 152-166 | 5 | 32 | (ATAGAA) ₂ + (AAAA) ₂ + (AAAAA) ₂ |
| SSRMUM5 | 169-187 | 2 | 39 | (ATTCAG) ₂ + (ATTTACA) ₂ |

7.4.4 Análisis de diversidad genética mitocondrial.

El AMOVA indicó que la mayor parte de la varianza de *U. maydis* se ubica dentro de las poblaciones (84%), y entre poblaciones (16%), según el estadístico $F_{ST} = 0.15$ indica que existe diferenciación genética moderada (Cuadro 8). El análisis estadístico de heterocigosidad en los aislamientos de *U. maydis* mostró que existen en promedio 2.4 alelos por locus. El número efectivo de alelos (A_e) corresponde a 1.066, indicando el número de alelos que pueden estar presentes en una población.

Cuadro 8. Análisis de Varianza Molecular AMOVA.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados Medios | Varianza estimada | Varianza (%) |
|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------|
| Entre poblaciones | 9 | 159055.831 | 17672.870 | 1766.409 | 16% |
| Dentro de poblaciones | 38 | 358325.794 | 9429.626 | 9429.626 | 84% |
| Total | 47 | 517381.625 | | 11196.036 | 100% |

El análisis de conglomerados clasificó a los aislamientos de *U. maydis* en dos grupos (Fig. 10). El grupo A incluye 24 individuos: 3 de Guanajuato, 3 de Hidalgo, 4 de Zacatecas, 1 de Puebla, 6 de Jalisco, 4 de Tamaulipas y 3 de Chiapas. Todos los individuos de este grupo comparten los SSRMUM 2, 3, 4 y 5 a excepción de los individuos GTODOL01 y CHIRV1 que solo comparten los SSRMUM 2, 3 y 4, por esta razón son los más distantes de este grupo. El grupo B presenta 24 individuos: 1 de Puebla, 3 de Tlaxcala, 2 de Querétaro, 2 de Michoacán, 6 de Guanajuato, 3 de Hidalgo, 3 de Zacatecas, 3 de Chiapas, y 1 de Jalisco. Todos los individuos aquí agrupados presentan los 5 SSRmt, a excepción de los individuos MICQRO09 y TLAHUA07 que no presentan el SSRMUM 2 (Anexo 2).

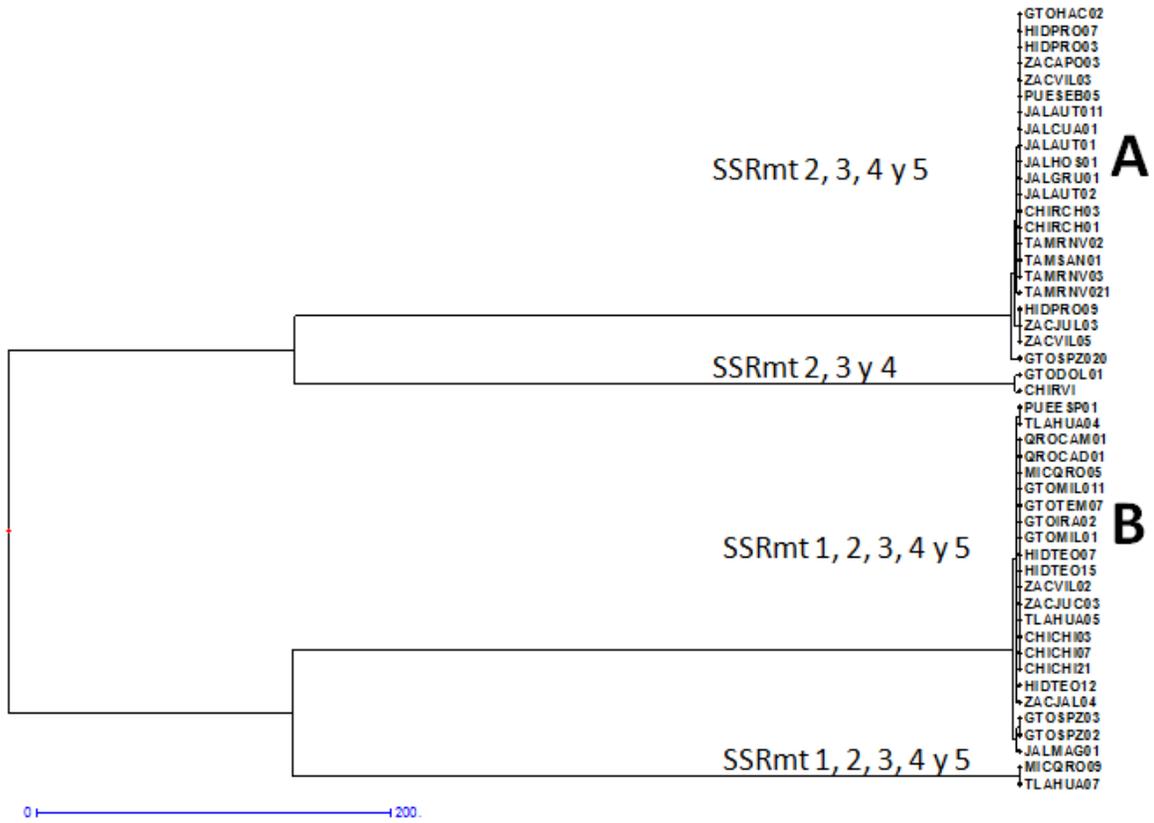


Figura 10. Dendrograma UPGMA mostrando las relaciones genéticas con base en mtSSRs de los 48 aislamientos de *U. maydis*.

7.4.5 Análisis de estructura de poblaciones a nivel mitocondrial.

El análisis bayesiano de la estructura de poblaciones de los aislamientos de *U. maydis* descrito por Falush y colaboradores (2003) mostró el máximo valor de ΔK cuando $K=2$ (Fig. 11), lo cual indica que existen dos poblaciones estimadas para los 48 individuos de *U. maydis*, diferenciadas con color verde y rojo como se observa en la Figura 12. Cada individuo está representado por una barra vertical, el orden en el que se presentan los 48 individuos es el mismo que el mostrado en el Cuadro 4.

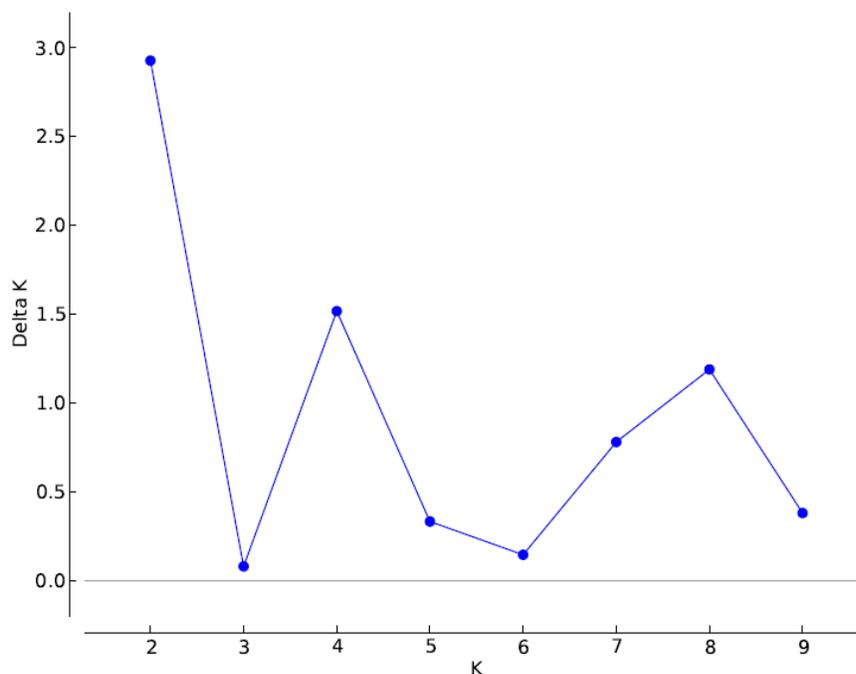


Figura 11. Análisis de estructura poblacional de *U. maydis*. En donde Delta K=2 es considerado el nivel más alto de estructura.

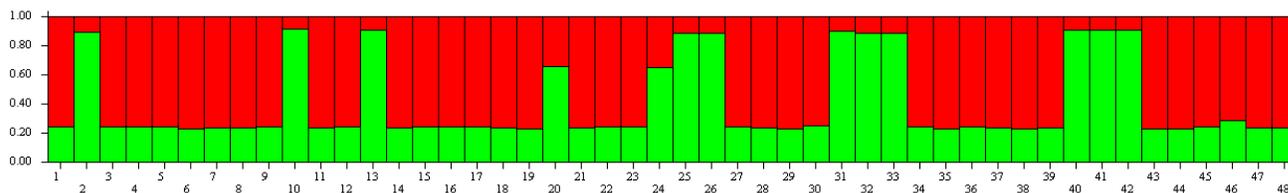


Figura 12. Diagrama de barras indicando las proporciones inferidas en las poblaciones de *U. maydis* mediante el análisis bayesiano. Los números asignados a los aislamientos se indican en el Cuadro 4.

7.5 Análisis de SSR mitocondriales en *U. maydis*

7.5.1 Aislamientos de *U. maydis* empleados en el análisis de los SSRmt.

El muestreo de los tumores de *U. maydis* incluidos en el análisis de diversidad genética nuclear fue realizado en catorce estados de la República Mexicana (Cuadro 3). El promedio de tumores colectados por estado fue de 11 (Cuadro 3).

7.5.2 Amplificación de los SSRnucleares.

Los aislamientos de *U. maydis* fueron utilizados para amplificar los SSRnu en la (Fig. 13) se muestra un gel típico de acrilamida teñido con nitrato de plata, en el cual puede apreciarse la variación en el tamaño de peso del microsatélite 1.53 amplificado en 50 aislamientos de *U. maydis* colectados en diferentes estados de México.

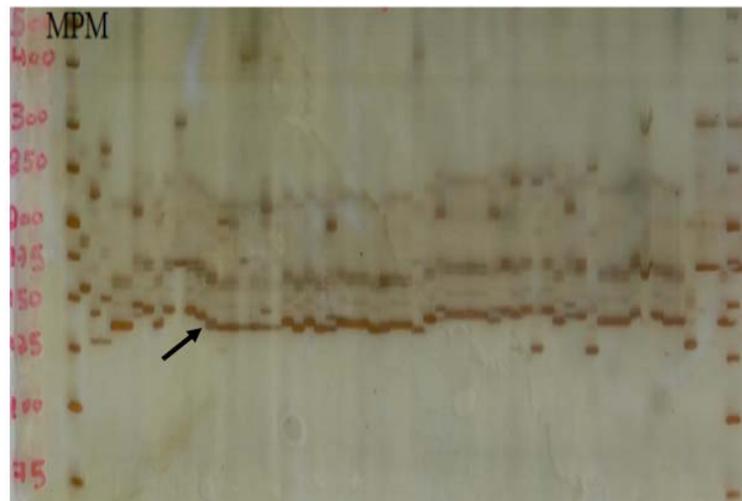


Figura 13. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 6% mostrando productos de PCR correspondientes al microsatélite 1.53 de *U. maydis*. Tamaño de fragmento esperado 160 pb. MPM Hyperladder V.

Los fragmentos amplificados por PCR que comprendían los SSRnu variaron de 99 a 573 pb, y las longitudes de los repetidos oscilaron entre 30 y 517 bases. Fueron encontrados veinte tipos diferentes de motivos repetidos.

El SSRnu 1.230 es el más largo y complejo, presenta 11 tipos de motivos diferentes $(GCT)_{16}+(CGA)_{26}+(TGG)_8+(CATCA)_7+(TTGA)_8+(GA)_{32}+(CAA)_{12}+(CCC)_7+(CC)_7+(TTG GCCT)_8+(AGC)_7$, y es el menos polimórfico con 3 variantes alélicas.

El SSRnu 1.86 es el más simple, presenta 1 motivo (CA), y presenta 20 variantes alélicas, siendo el más polimórfico. Las características de los SSRnu se resumen en el (Cuadro 9)

Cuadro 9. Características de los SSRnu identificados en *U. maydis*.

| Clave | Motivo | No. De alelos esperados según Munkacsí <i>et al.</i> , 2006 | No. De alelos encontrados en este estudio | *Clasificación | Longitud del SSR amplificado |
|-------|---|---|---|----------------|------------------------------|
| 1.221 | CGCTTTT | 6 | 9 | perfecto | 28 |
| 1.53 | CAT | 12 | 16 | imperfecto | 78 |
| 1.21 | GAATCGT | 10 | 16 | perfecto | 224 |
| 1.73 | GCTTT | 16 | 3 | perfecto | 125 |
| 1.86 | CA | 11 | 20 | imperfecto | 74 |
| 1.95 | GCAACA | 11 | 6 | perfecto | 105 |
| 1.97 | CACGATT | 11 | 5 | perfecto | 84 |
| 1.230 | (GCT) ₁₆ +(CGA) ₂₆ +(TGG) ₈ +(CATCA) ₇ +(TTGA) ₈ +(GA) ₃₂ +(CAA) ₁₂ +(CCC) ₇ +(CC) ₇ +(TTGGCCT) ₈ +(AGC) ₇ | 11 | 3 | Imperfecto | 517 |
| 1.168 | GATGCT | 6 | 10 | perfecto | 59 |
| 1.249 | CTGCT | 10 | 11 | perfecto | 30 |

*Wang *et al.*, 2009.

7.5.3 Análisis de diversidad genética nuclear.

El AMOVA indicó que la mayor parte de la varianza de *U. maydis* se ubica dentro de poblaciones (83%), y entre poblaciones (17%). De acuerdo al estadístico de Wright ($F_{ST} = 0.166$) existe una diferenciación genética grande en las poblaciones de *U. maydis* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de Varianza Molecular AMOVA.

| Fuente de Variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados Medios | Varianza estimada | Varianza (%) |
|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------|
| Entre poblaciones | 13 | 485.498 | 37.346 | 2.359 | 17% |
| Dentro de poblaciones | 141 | 1671.386 | 11.854 | 11.854 | 83% |
| Total | 154 | 2156.884 | | 14.213 | 100% |

Estadístico $F_{ST} = 0.166$

El número promedio de alelos diferentes (N_a) en la población analizada es 3.4. El estado de Michoacán presentó el mayor número de alelos diferentes con 6.7, y en el estado de Querétaro se observó el menor número de variantes alélicas que corresponde a 1.4. El estado de Nayarit presentó la mayor heterocigosidad (0.350), mientras que en las muestras de Campeche se encuentra la menor heterocigosidad observada (0.100). Michoacán mostró la mayor

heterocigosidad esperada (0.661), y le menor se encontró en Querétaro (0.163). El porcentaje de polimorfismo (%P) promedio en los individuos estudiados corresponde a 74.29. Michoacán y Tamaulipas presentaron un polimorfismo del 100%, en contraparte, el menor polimorfismo se encontró en Querétaro (30%) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Estadísticos de diversidad genética en *U. maydis* estimados con base en SSR nucleares.

| Población | No. De localidades | No. De aislamientos | Na | Ho | He | %P |
|------------------|--------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| Tamaulipas | 5 | 14 | 4.700 | 0.307 | 0.604 | 100 |
| Chiapas | 2 | 18 | 3.600 | 0.316 | 0.475 | 90 |
| Guanajuato | 7 | 14 | 3.400 | 0.252 | 0.461 | 80 |
| Hidalgo | 3 | 16 | 3.200 | 0.197 | 0.436 | 90 |
| Oaxaca | 3 | 6 | 2.700 | 0.318 | 0.388 | 70 |
| Jalisco | 11 | 19 | 5.000 | 0.240 | 0.572 | 90 |
| Tlaxcala | 1 | 3 | 1.600 | 0.167 | 0.279 | 50 |
| Nayarit | 2 | 3 | 1.800 | 0.350 | 0.342 | 60 |
| Zacatecas | 7 | 15 | 5.800 | 0.301 | 0.459 | 90 |
| Querétaro | 1 | 2 | 1.400 | 0.200 | 0.163 | 30 |
| Puebla | 4 | 8 | 3.800 | 0.160 | 0.497 | 80 |
| Michoacán | 11 | 21 | 6.700 | 0.250 | 0.661 | 100 |
| Estado de México | 3 | 7 | 2.500 | 0.245 | 0.368 | 70 |
| Campeche | 2 | 9 | 1.700 | 0.100 | 0.226 | 40 |
| Total | 62 | 155 | 3.421 | 0.243 | 0.424 | 74.29 |

Alelos diferentes (Na), Heterocigosidad observada (Ho) Heterocigosidad esperada (He), Porcentaje de polimorfismo (%P).

El análisis de conglomerados clasificó a los 155 aislamientos de *U. maydis* en dos grupos principales A y B. El grupo A se subdivide en A1, A2, A3 y A4, mientras que el grupo B se subdivide en B1 y B2 (Figura 14). El subgrupo A1 incluye 28 individuos: 9 de Hidalgo, 3 de Oaxaca, 11 de Guanajuato, 4 de Jalisco, y 1 de Tlaxcala, en este grupo están presentes la mayoría de los individuos colectados en el estado de Guanajuato (Figura 15). El subgrupo A2 contiene 24 individuos: 3 de Guanajuato, 4 de Tamaulipas, 7 de Hidalgo, 6 de Jalisco, 3 de Nayarit, y 1 de Zacatecas (Figura 15). El subgrupo A3 presenta 31 individuos: 9 de Jalisco, 17 de Chihuahua, 2 de Tamaulipas y 3 de Oaxaca; en este grupo están presentes la mayoría de los individuos de Chihuahua (Figura 16). El subgrupo A4 posee 27 individuos: 9 de Campeche, 2 de Tlaxcala, 8 de Tamaulipas, 1 de Chiapas, 5 de Michoacán y 2 de Puebla, y todos los aislamientos de Campeche (Figura 16). El subgrupo B1 presenta 28 aislamientos de *U. maydis*: 10 de Zacatecas, 7 del Edo. De México, 6 de Michoacán, 3 de Puebla, y 2 de Querétaro, además de la mayoría de los aislamientos de Zacatecas (Figura 17). El subgrupo

B2 contiene 17 aislamientos: 10 de Michoacán, 4 de Zacatecas y 3 de Puebla, el 50% de los aislamientos de Michoacán están incluidos en este grupo (Figura 17).

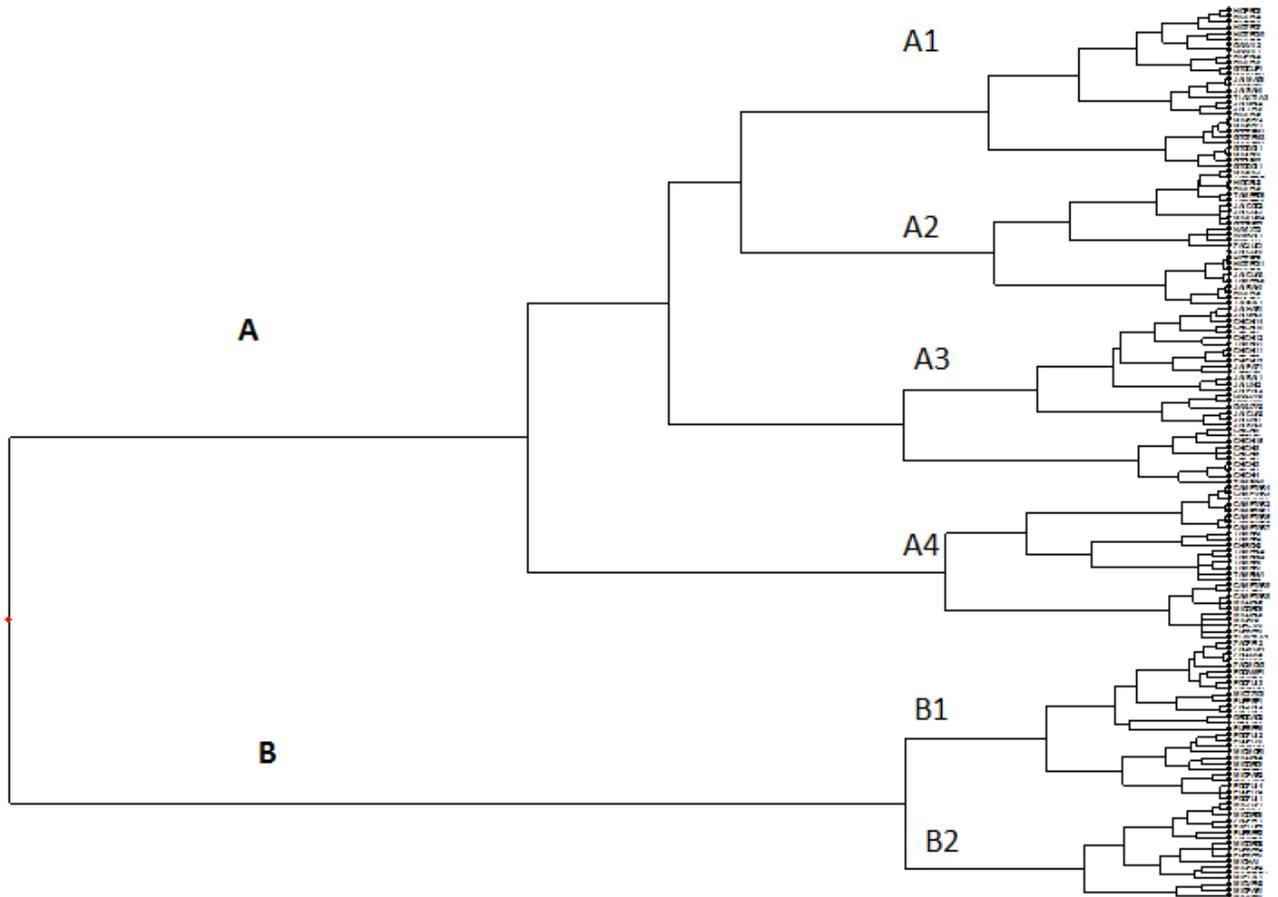


Figura 14. Dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de 155 aislamientos de *U. maydis* colectados en México.

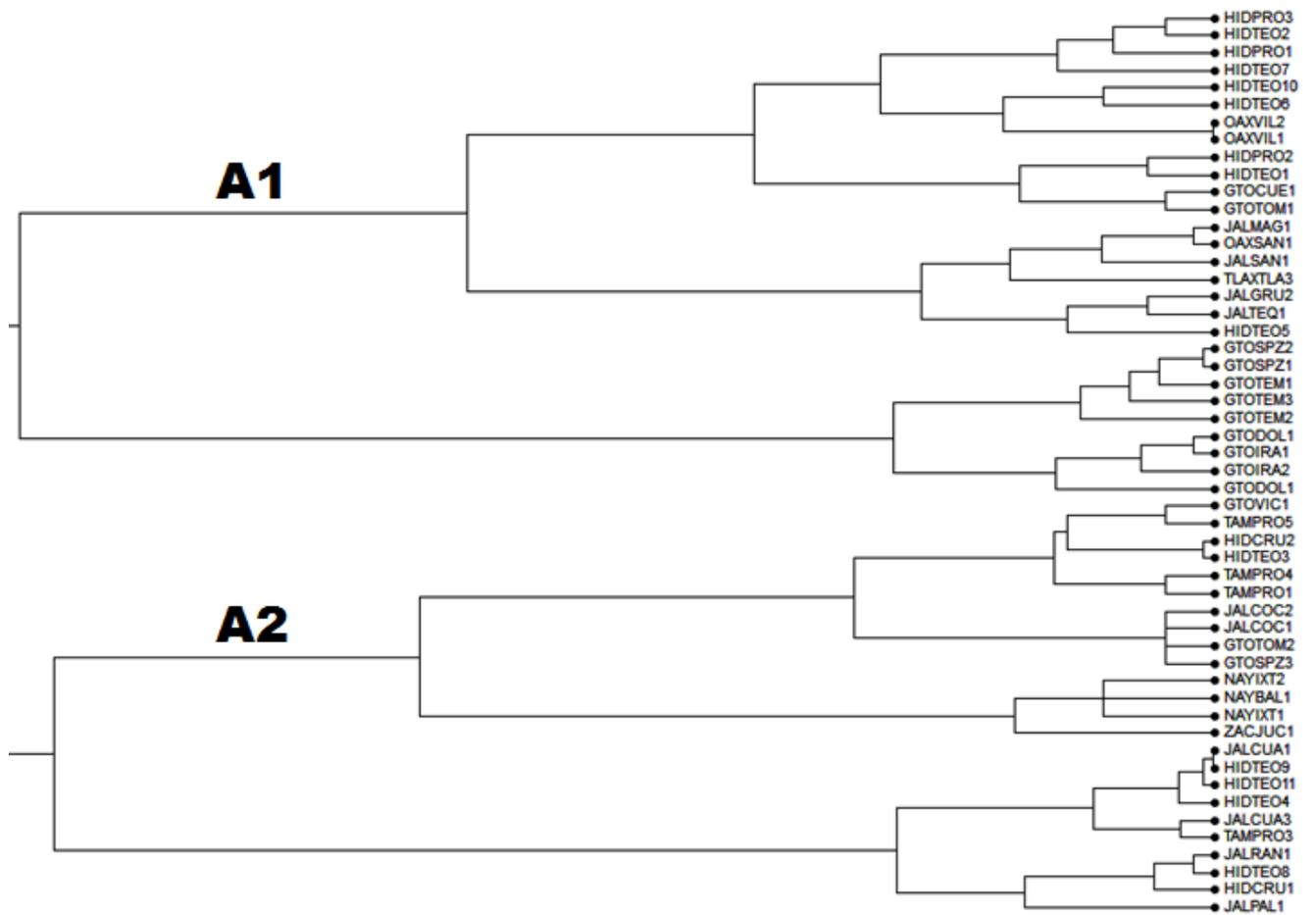


Figura 15. Acercamiento del dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de los subgrupos A1 y A2 de *U. maydis*.

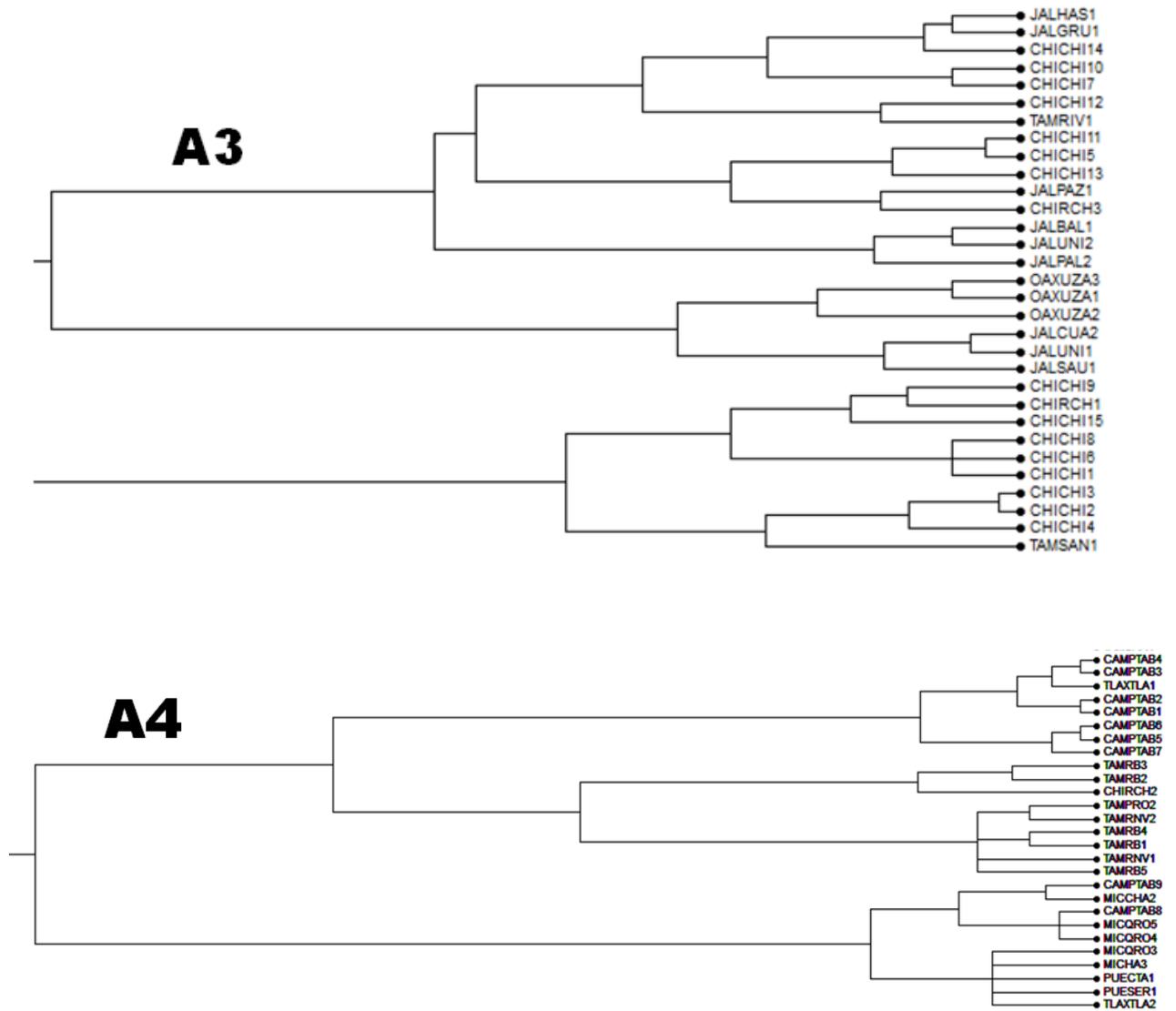


Figura 16. Acercamiento del dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de los subgrupos A3 y A4 de *U. maydis*.

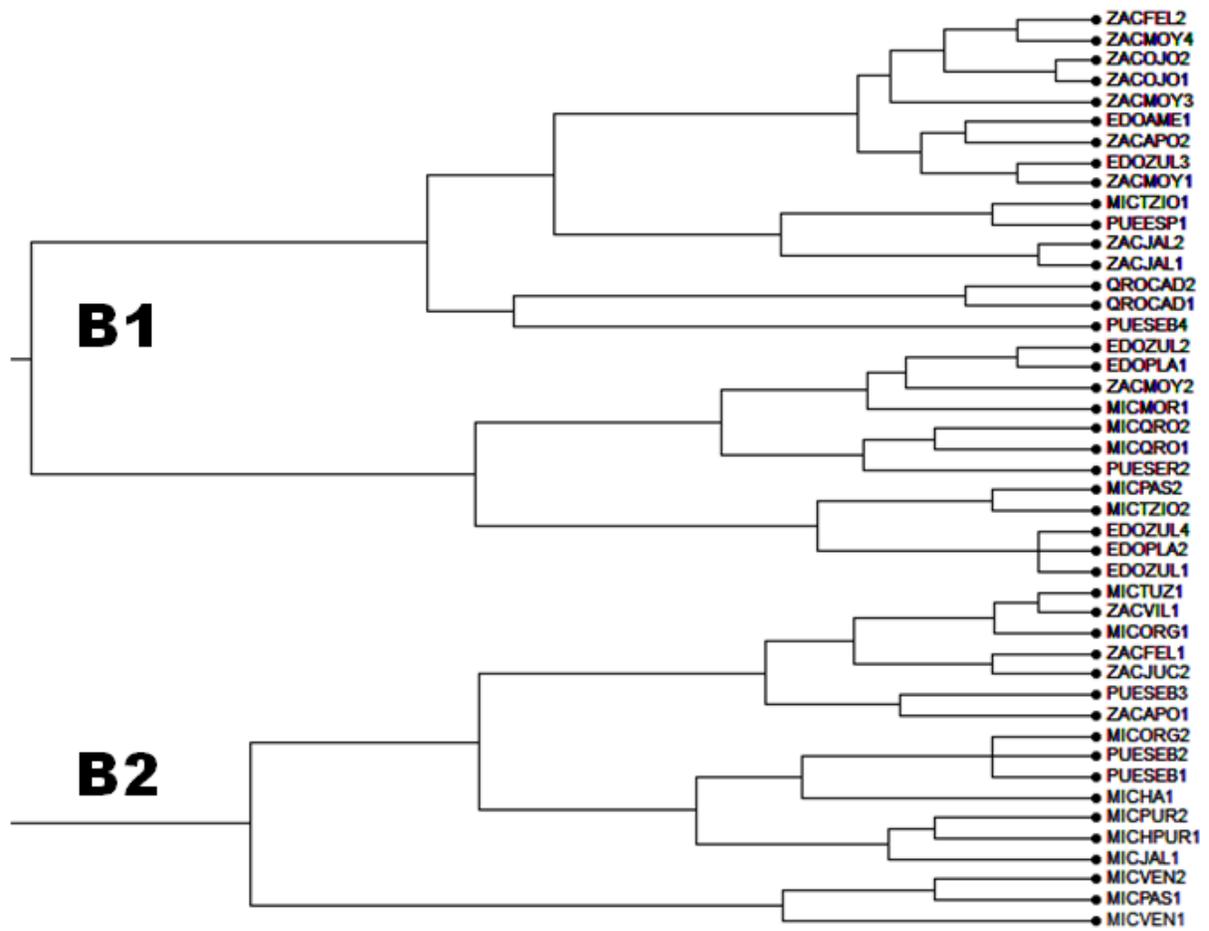


Figura 17. Acercamiento del dendrograma obtenido con el método de Neighbor-Joining con base en datos SSRnu que muestra las relaciones genéticas de los subgrupos B1 y B2 de *U. maydis*.

7.5.4 Análisis de estructura de poblaciones a nivel nuclear.

El análisis bayesiano de la estructura poblacional de los aislamientos de *U. maydis* se llevó a cabo otorgando la subestructura óptima de $K = 14$ asumiendo que cada estado correspondía a una población. El modelo estadístico descrito por Falush y colaboradores (2003) mostró el máximo valor de ΔK cuando $K = 2$, lo cual indica que existen dos poblaciones estimadas para los 155 individuos de *U. maydis* (Fig. 18) diferenciadas con color verde y rojo (Figura 19). Cada individuo está representado por una barra vertical (Figura 20), el orden en el que se presentan los 155 individuos se encuentran en el cuadro 3.

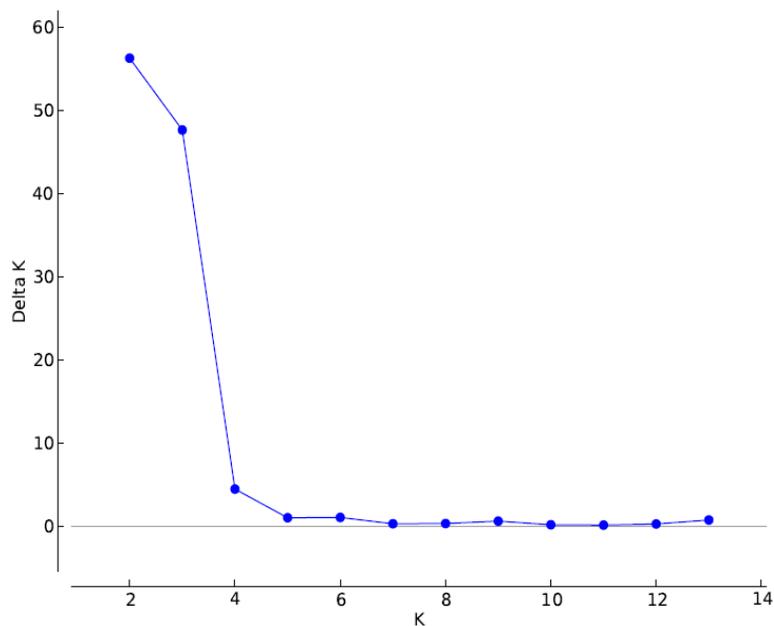


Figura 18. Análisis de estructura poblacional de *U. maydis*. Delta $K=2$ es considerado el nivel más alto de estructura.

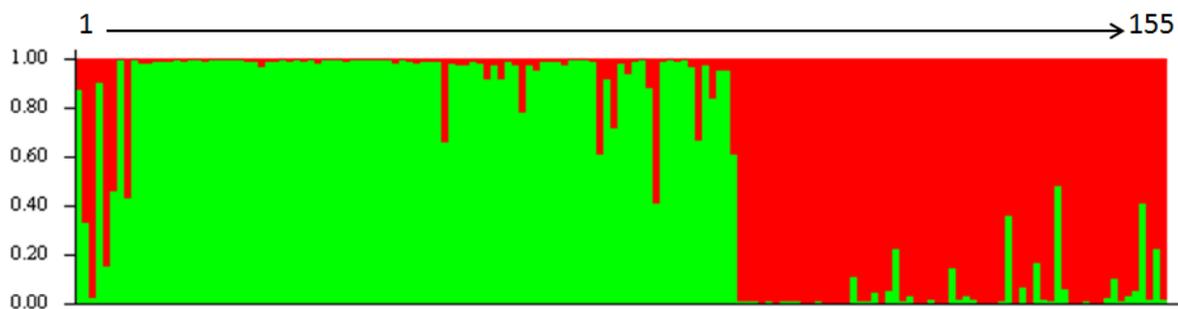


Figura 19. Diagrama de barras indicando las proporciones inferidas en las poblaciones de *U. maydis* mediante el análisis bayesiano. Los números asignados a los aislamientos se indican en el Cuadro 3.

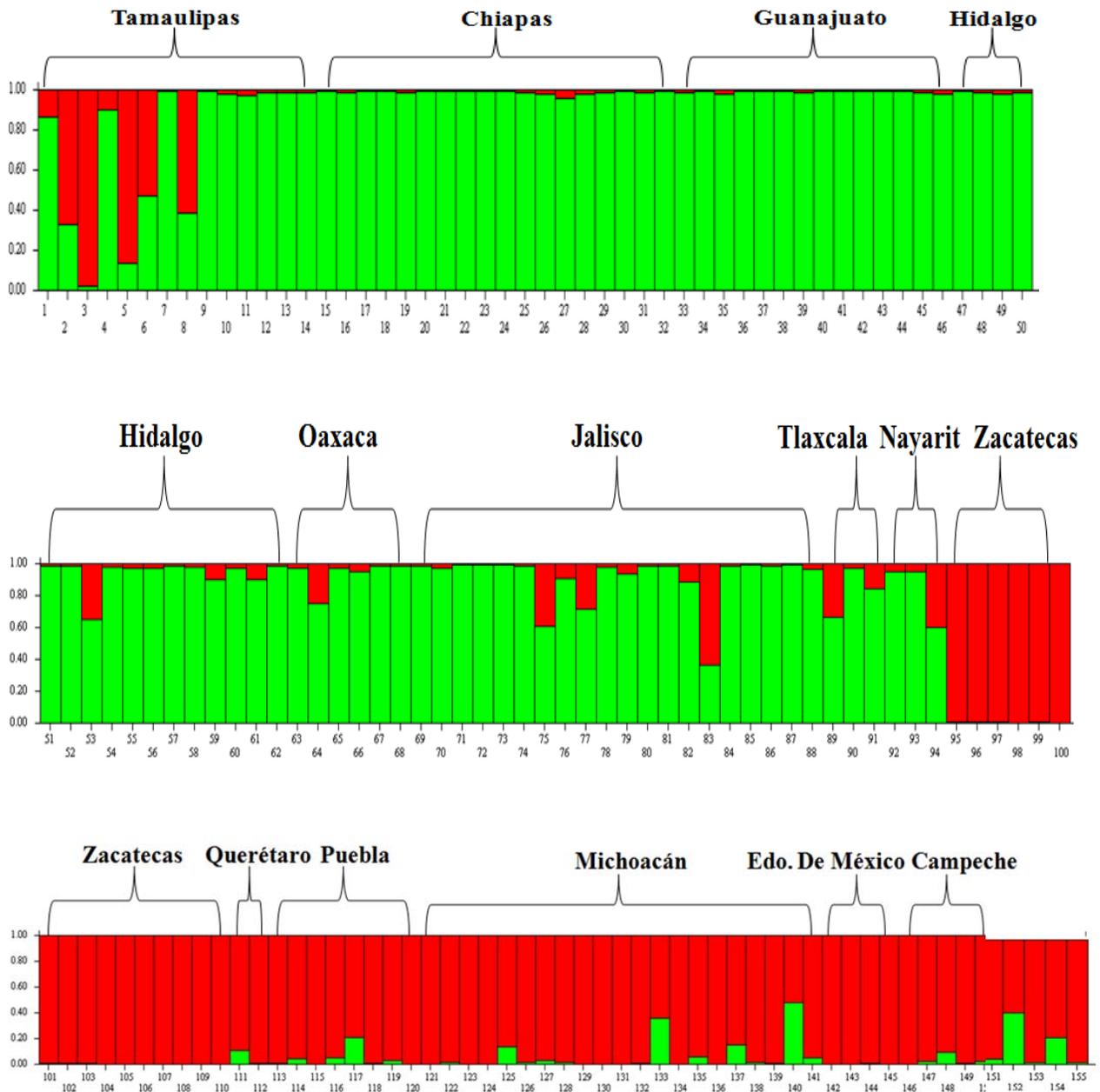


Figura 20. Acercamiento del Diagrama de barras indicando las proporciones inferidas en las poblaciones de *U. maydis* mediante el análisis bayesiano. Los números asignados a los aislamientos se indican en el Cuadro 3.

7.5.5 Prueba de Mantel

La prueba de Mantel indicó que no existe una correlación positiva significativa entre las distancias genéticas y las geográficas de los 155 aislamientos de *U. maydis* evaluados (coeficiente de correlación $R_{xy} = 0.033$) (Fig. 21).

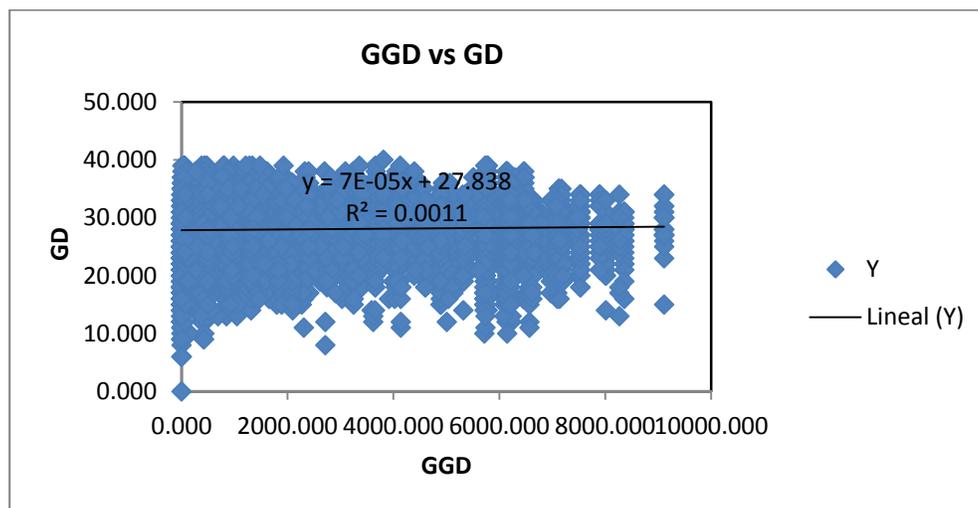


Figura 21. Modelo de regresión obtenido a partir del Test de Mantel. GGD: Distancia geográfica. GD: Distancia genética.

7.6 Determinación del tipo de apareamiento *a* y *b* mediante la reacción fuzz.

Mediante la reacción fuzz positiva se identificaron algunas de las cepas sexualmente compatibles provenientes de los tumores, como se muestra en la Figura 22.

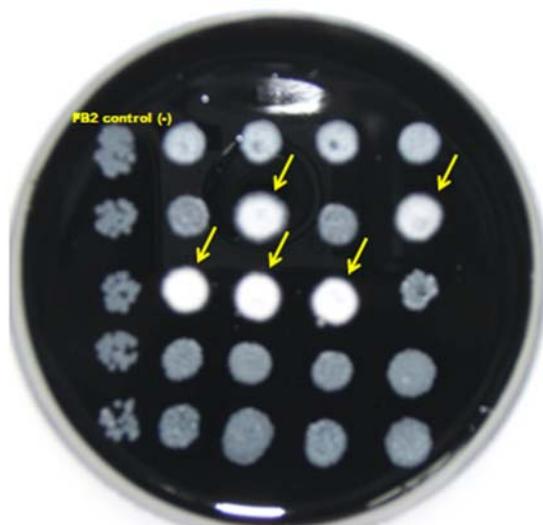


Figura 22. Prueba de la reacción fuzz en placa. Las cepas que mostraron reacción positiva señaladas con flechas amarillas.

7.6.1 Amplificación del locus *a* por PCR.

El tamaño del fragmento amplificado para el alelo a1 de *U. maydis* con los oligonucleótidos Forward pra1 y Reverse pra1 fue de 666 pb. El tamaño de fragmento amplificado para el alelo a2 con los oligonucleótidos Forward Umpra 2S y Reverse Umpra 2R fue de 333 pb (Cuadro 2, Fig. 23).

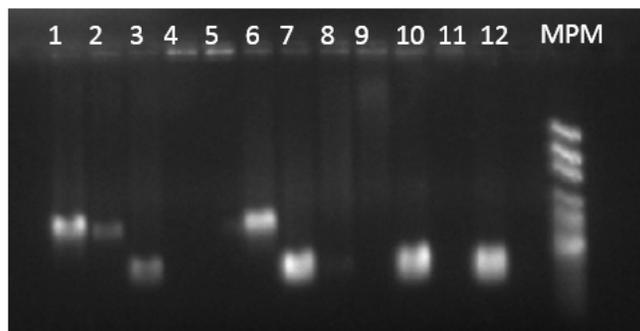


Figura 23. Gel de agarosa al 1% mostrando productos de PCR correspondientes al alelo a1 y a2 de aislamientos de *U. maydis* colectados en Tlaxcala. Tamaño de fragmento esperado para el alelo a1 corresponde a 666 pb, tamaño de fragmento esperado para el alelo a2 corresponde a 333pb MPM Oxygen Ladder.

7.6.2 Amplificación del locus *b* por PCR.

Los fragmentos amplificados del locus *b* de *U. maydis* con los oligonucleótidos (Forward 1484 y Reverse 2719) incluyó parte del gen *bW* o del gen *bE*, cuyo tamaño de fragmento esperado fue de 1.2 kb (Cuadro 2, Fig. 24). La identidad del locus *b* fue resuelta mediante secuenciación.

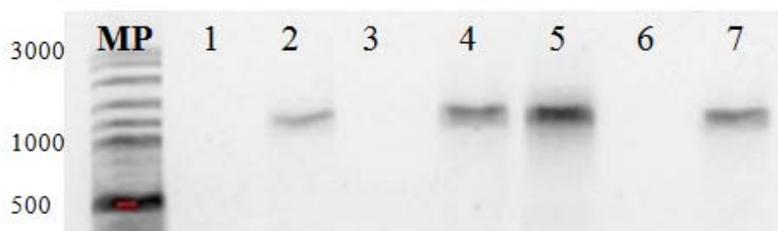


Figura 24. Gel de agarosa al 1% mostrando productos de PCR correspondiente al locus *b* de 7 aislamientos de *U. maydis* colectados en Tlaxcala. MPM Hiperladder Vivantis.

7.6.3 Análisis Bioinformático de las secuencias del locus b de *U. maydis*.

Las variantes alélicas reportadas a la fecha son 25 (*b1, b2, b3, b4, b4a, b4b, b5, b6, b6a, b6, b6c, b7, b19, b8, b9, b10, b10a, b11, b12, b13, b14, b15, b16, b17, b18, b18a*). En el presente trabajo fueron identificadas 12 (*b7, b14, b15, b19, b18, b1, b17, b13, b9, b18a, y b3*), distribuidas en diferentes estados de la República Mexicana, el alelo *b7* es el más frecuente y los menos frecuentes fueron los alelos *b18a* y *b3* véase (Cuadro 12).

Cuadro 12. Variantes alelicas b identificadas por estado.

| Estados | Variantes alélicas identificadas |
|----------------|--|
| Tamaulipas | b7, b14, b15, b19 |
| Chiapas | b7, b17, b13, b19, b18, b14 |
| Guanajuato | b14, b9, b13, b7, b18, b17, b15, 18a |
| Hidalgo | b19, b7, b1, b15, b18, b14, b13, b17 |
| Oaxaca | b7, b17 |
| Jalisco | b19, b15, b18, b7, b14, b9, b13, b18a, b17 |
| Tlaxcala | b15, b7, b14, b18, b17, b13, b11 |
| Nayarit | b3, b7, b13, b18 |
| Zacatecas | b7, b18a, b18, b14, b15, b19, b9, b17 |
| Querétaro | b7, b14, b18, b19 |
| Puebla | b13, b15, b17, b18, b19, b7 |
| Michoacán | b7, b9, b15, b18 |
| Edo. De México | - |
| Campeche | - |
| Total | 12 |

7.7 Ensayos de patogénesis de *U. maydis*

7.7.1 Ensayos en invernadero.

En los ensayos en invernadero, inicialmente 18 tratamientos fueron probados en plantas de maíz cacahuacintle. La inoculación endógena mediante la inyección de las esporidias fue el más efectivo. El experimento fue evaluado mediante la escala de severidad descrita en metodología Figura 25.



Figura 25. A, B, C, D, E y F. Escala de severidad de los síntomas otorgada en la formación de tumores en plantas de maíz. **A)** 1= planta sana, **B)** 2= presencia de antocianinas y clorosis, **C)** 3= tumores no visibles pero tangibles en hojas, **D)** 4= tumores pequeños en tallos y hojas, **E)** 5= tumores grandes en tallos y hojas, y **F)** 6= planta marchita ó muerta.

El cuadro 13 muestra los resultados de la inoculación endógena de plantas de maíz (var. Cacahuacintle) en invernadero. El control positivo fue el tratamiento más severo, seguido del tratamiento 3.

Cuadro 13. Resultados obtenidos de 4 tratamientos probados en invernadero con plantas de maíz.

| Tratamiento | Clave de cepas | Tipo de variantes alélicas | No. De plantas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|----------------|----------------------------|----------------|-----|-------|------|---|------|------|
| 1 | TLACIB01 | a1b13 | 50 | 36 | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | TLAMDO024 | a2b17 | 50 | 33 | 12 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| | TLAMDO021 | a1b11 | | | | | | | |
| 3 | TLAMDO024 | a2b17 | 50 | 31 | 10 | 3 | 2 | 4 | 0 |
| | TLAMDO0311 | a1b17 | | | | | | | |
| 4 | TLAMDO0312 | a2bx | 50 | 36 | 7 | 1 | 4 | 1 | 1 |
| | TLAMDO001 | a1b11 | | | | | | | |
| | TLAMDO024 | a2b17 | | | | | | | |
| Control positivo | FB1 | a1b1 | 25 | 15 | 5 | 2 | 0 | 3 | 0 |
| | FB2 | a2b2 | | | | | | | |
| Total | - | - | 225 | 151 | 47 | 6 | 9 | 11 | 1 |
| PI | 32.88 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| % de formación de tumores | 12 | - | - | - | - | 2.66 | 4 | 4.88 | - |
| % de severidad en plantas | - | - | - | - | 20.88 | 2.66 | 4 | 4.88 | 0.44 |

SEV1= planta sana, SEV2= presencia de antocianinas y clorosis, SEV3= tumores no visibles pero tangibles en hojas, SEV4= tumores pequeños en tallos y hojas, SEV5= tumores grandes en tallos y hojas, SEV6= planta marchita ó muerta. PI = Porcentaje de Incidencia.

La comparación estadística de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Chi Cuadrada (χ^2), y con base en el valor de tablas que corresponde a 9.49 indica que los tratamientos son iguales (Cuadro 14).

Cuadro 14. Chi cuadrada (χ^2) de los tratamientos probados en invernadero.

| Tx. | Oi | Ei | (O-E) | (O-E) ² | (O-E) ² /E |
|-----|----|------|-------|--------------------|-----------------------|
| T1 | 66 | 81.2 | -15.2 | 231.04 | 2.8453202 |
| T2 | 80 | 81.2 | -1.2 | 1.44 | 0.01773399 |
| T3 | 88 | 81.2 | 6.8 | 46.24 | 0.56945813 |
| T4 | 80 | 81.2 | -1.2 | 1.44 | 0.01773399 |
| T5 | 92 | 81.2 | 10.8 | 116.64 | 1.4364532 |
| | | | | | 4.88669951 |

Oi frecuencia observada, Ei frecuencia esperada, (O-E) frecuencia observada menos la esperada, (O-E)² frecuencia observada menos la esperada al cuadrado, (O-E)²/E frecuencia observada menos la esperada al cuadrado dividido entre lo esperado. Valor de tablas de Ji cuadrada es igual 9.49.

7.7.2 Ensayos en campo.

El cuadro 15 muestra los resultados de las variables analizadas en los 6 tratamientos y los controles positivo y negativo aplicados con esporidias sexualmente compatibles de *U. maydis* probadas en plantas de maíz AZ-60 para la inducción del huitlacoche. 640 plantas fueron inoculadas vía endógena (Cuadro 15). El tratamiento 5 mostró el mayor porcentaje de incidencia (PI) que corresponde a 28.75, y el rendimiento total de huitlacoche obtenido con el tratamiento 5 fue de 825.5 g, el cual superó al obtenido con el control positivo. El tratamiento 4 mostró un PI del 12.5%, con un rendimiento total de 474 g de huitlacoche, igualando al control positivo. El tratamiento 3 mostró el menor PI que corresponde a 2.5%, y un rendimiento total de 20 g de huitlacoche. El total del huitlacoche obtenido considerando todos los tratamientos corresponde a 2476 g (Cuadro 15).

Cuadro 15. Ensayos de patogenicidad de cepas de *U. maydis* en campo.

| Tx. | No. de plantas | Peso maíz g | Longitud maíz (cm) | SEV 1 | SEV2 | SEV3 | SEV4 | SEV5 | PI% | Rendimiento (g) |
|-------|----------------|-------------|--------------------|-------|------|------|------|------|-------|-----------------|
| Tx1 | 80 | 12762 | 15.886 | 75 | 3 | 1 | - | 1 | 6.25 | 654 |
| Tx.2 | 80 | 13036 | 16.7 | - | 4 | 2 | 2 | - | 10 | 200.5 |
| Tx.3 | 80 | 11905 | 15.75 | 78 | 1 | - | - | 1 | 2.5 | 20 |
| Tx.4 | 80 | 13828.6 | 16.8 | 70 | 1 | 5 | 2 | 2 | 12.5 | 474 |
| Tx.5 | 80 | 13280 | 16.725 | 57 | 12 | 8 | 1 | 2 | 28.75 | 825.5 |
| Tx. 6 | 80 | 13396 | 16.855 | 77 | 2 | - | 1 | - | 3.75 | 22 |
| C+ | 80 | 13165 | 16.69125 | 70 | 2 | 5 | 2 | 1 | 12.5 | 280 |
| C- | 80 | 13267 | 16.65 | 80 | - | - | - | - | 0 | 0 |
| Total | 640 | 10463g | 16.5 | 579 | 25 | 21 | 8 | 7 | 7.5 | 2476g |

SEV1, SEV2, SEV3, SEV4 y SEV5: grados de severidad de cubrimiento de mazorca por agallas (0, 25, 50, 75 y 100%) PI: porcentaje de incidencia (%).

Los tratamientos fueron comparados mediante un análisis de varianza ANOVA utilizando el método de Tukey, el cual corrobora que en el tratamiento 5 existe diferencia significativa con respecto al control positivo al mostrar mayor patogenicidad (Cuadro 16).

Cuadro 16. ANOVA realizado mediante el método de Tukey.

| Tratamiento | Media | Valor F: 0.05 |
|------------------|---------|---------------|
| 5 | 137.625 | a |
| Control + | 39.000 | b |
| 4 | 34.750 | bc |
| 2 | 10.625 | cd |
| 1 | 6.000 | d |
| 6 | 5.500 | d |
| 3 | 5.000 | d |
| Control - | 0.000 | d |

XIII DISCUSIÓN

Colecta de tumores de *U. maydis* en la República Mexicana.

Los aislamientos de *U. maydis* fueron colectados durante los meses de julio y octubre en las zonas de México donde se ha reportado la mayor producción de maíz según Muñoz (2005). Los tumores de *U. maydis* fueron obtenidos principalmente de maíces criollos, ya que en más del 75% de la superficie mexicana se utiliza semilla de variedades criollas (SIACON-SAGARPA, 2014). La temperatura anual promedio de las localidades muestreadas osciló entre los 17 a 30°C, el tipo de clima de las localidades varía de templado a cálido. La altitud de los sitios muestreados fue muy variable, desde 40 hasta 2500 metros sobre el nivel del mar. Lo anterior indica que *U. maydis* al igual que el maíz, está adaptado a un amplio rango de condiciones ambientales (Villanueva, 2006).

Análisis de la diversidad genética de *U. maydis* con base en SSRmt.

Los programas Tandem Repeat Finder (Benson, 1999), y Tandem Repeat Occurrence Locator (Castelo *et al.*, 2002) identificaron exactamente los mismos mtSSR (SSRMUM1, SSRMUM2, SSRMUM3, SSRMUM4 y SSRMUM5) en el genoma mitocondrial de *U. maydis*.

En el presente trabajo fueron localizados 5 mtSSR de entre 29 a 69 pb de longitud, que con base en la disposición de los nucleótidos fueron clasificados como compuestos imperfectos (Wang *et al.*, 2009). La identidad de los SSRmt fueron corroborados mediante secuenciación. Los marcadores moleculares mitocondriales diseñados en este trabajo permitieron identificar 12 alelos en total, de los cuales SSRMUM04 fue el más polimórfico ya que identificó 5 variantes alélicas, seguido de SSRMUM01, SSRMUM 03, SSRMUM05 que poseen dos variantes alélicas cada uno, y el SSRMUM 02 que solo tiene un alelo. Mahfooz y colaboradores (2012) utilizaron la plataforma WebSat para la búsqueda de SSR mitocondriales en hongos fitopatógenos. Los parámetros de búsqueda tomados como base fueron una longitud mínima de 12 nucleótidos, independientemente de la longitud del repetido (mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótidos). En el caso de *U. maydis* se encontraron 16 SSR, 11 de ellos están en regiones codificantes y 5 en regiones intergénicas. En comparación con los resultados obtenidos por dichos autores, los mtSSR identificados fueron situados exclusivamente en regiones intergénicas y son de mayor longitud, por lo

tanto, los mtSSR aquí descritos no fueron considerados por Mahfooz y colaboradores (2012) para su análisis.

En genomas mitocondriales de varias especies los SSR están localizados principalmente en regiones intergénicas (Kuntal *et al.*, 2012), y existen especies fúngicas como *Aspergillus oryzae* y *Phaeosphaeria nodorum* que no presentan SSRmt en regiones codificantes. El tamaño del genoma mitocondrial de *U. maydis* es similar al promedio de diversos hongos fitopatógenos, sin embargo el número de SSR que identificamos está por debajo del valor promedio en este tipo de hongos (Mahfooz *et al.*, 2012).

La escasa identificación de microsátélites en el DNAm de *U. maydis* puede deberse a diversas razones: el tamaño y la tasa de mutación en el genoma de organelos es menor que en el DNA nuclear (Zhan *et al.*, 2002); como ha sido sugerido para levaduras, puesto que la tasa base-sustitución en los genes mitocondriales es menor que en los nucleares (Clark-Walker 1992). Los SSRmt son de herencia materna, y por lo tanto el DNA es más conservado (Provan *et al.*, 1999; Bagshaw *et al.*, 2008). En los genomas de organelos existe menos DNA repetitivo que en los genomas nucleares y el DNA repetitivo es más susceptible a mutaciones (Sia *et al.*, 2000; Rajwant *et al.*, 2010). Croll y colaboradores (2008) analizaron la diversidad genética del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* mediante SSR nucleares y marcadores mitocondriales encontrando que el genoma mitocondrial no es homogéneo, y sugieren que es posible establecer una asociación de estos genotipos con rasgos fenotípicos del hongo o factores ambientales, incluyendo la asociación preferencial con un hospedero en particular. Por ello es posible que en *U. maydis* exista escasa variación alélica a nivel mitocondrial debido a que su único hospedero es el maíz y el teosinte.

En este trabajo la mayor parte de la variación genética en el DNAm se encontró dentro de las poblaciones de *U. maydis* (84%) y 16% de la variación genética se ubica entre poblaciones. Esto indica que la diversidad genética, producto de una alta recombinación del hongo, es mayor en escalas geográficas pequeñas, como lo han reportado Zambino *et al.* (1997), Valverde y colaboradores (2000) y Munkacsi y colaboradores (2006). Son escasos los reportes de estudio de la diversidad genética en *U. maydis*, particularmente empleando marcadores SSR. Valverde y colaboradores (2000) analizaron mediante Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del DNA nuclear de 30 muestras de *U. maydis* colectadas en cinco localidades de la República Mexicana (Irapuato, Oaxaca,

Pachuca, Toluca y Culiacán). Encontraron que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (77.46%), mientras que entre poblaciones fue menor (10.37%). Los valores de variación más altos (84%) encontrados en este trabajo pueden deberse al mayor número de aislamientos considerados en el estudio, que representan una mayor área geográfica analizada y un número mayor de localidades muestreadas. Los índices de diversidad genética indican que existe escasa variación alélica de los marcadores analizados en el DNA mitocondrial de *U. maydis*. En general esto puede deberse a que el apareamiento de *U. maydis* puede ocurrir desde el inicio de la germinación de las teliosporas, dado que los productos meióticos son sexualmente compatibles (Barnes, 2004) y poseen una alta tasa de recombinación sexual con otros miembros presentes en la población.

El dendrograma, con base en el método UPGMA, clasificó a los aislamientos de *U. maydis* en dos grupos principales con base en la presencia o ausencia de los marcadores mtSSRs así como sus respectivas variantes alélicas. En el grupo A están incluidos los individuos de *U. maydis* que tienen en común los marcadores SSRMUM 2, 3, 4, y 5. Los individuos GTODOL01 y CHIRVI, son genéticamente más distantes porque en comparación con el resto del grupo no tienen el SSRMUM5. Otra característica adicional del aislamiento CHIRVI es que presenta la variante alélica de 168 pb del mtSSR4, y el resto del grupo posee el alelo de 162 pb. En el grupo B están incluidos los aislados que presentan los cinco mtSSR, a excepción de los individuos MICQRO09 y TLAHUA07 que no tienen el SSRMUM2, por esta razón se clasifican fuera del grupo B. La inferencia de poblaciones mediante el análisis bayesiano no solo corroboró que existen 2 grupos principales, sino que también permite inferir que existen 4 subpoblaciones de *U. maydis* con base en las variantes alélicas que comparten.

Los individuos de *U. maydis* no fueron agrupados con base en su estado de origen ni zona biogeográfica (CONABIO, 2008), esto puede atribuirse a que su hospedero (*Zea mays*) está ampliamente distribuido y diversificado en México, la dispersión de las teliosporas del hongo es llevada a cabo por el viento, restos vegetales y el suelo, lo cual puede revelar la alta distribución del hongo en escalas pequeñas. Sin embargo el flujo génico debido al intercambio y la comercialización de semillas y el fruto del maíz (elote), que constituye una práctica cultural en el país, puede explicar la dispersión del hongo a cortas y grandes

distancias, aunado a que su presencia está sujeta a la amplia distribución del cultivo de su hospedero (Matsuoka *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2004).

Análisis de la diversidad genética de *U. maydis* con base en SSR nucleares.

Los nuSSRs de *U. maydis* presentan en total 20 tipos de motivos: siete trinucleótidos, que son los más frecuentes, cuatro heptanucleótidos, tres di y pentanucleótidos, dos hexanucleótidos, y un tetranucleótido siendo este tipo los menos comunes. El presente estudio concuerda con lo reportado por Karaoglu y colaboradores (2005) quienes encontraron que también en el genoma nuclear de *U. maydis* los dinucleótidos y trinucleótidos son los motivos más abundantes. Los marcadores moleculares microsatélites diseñados por Munkacsi y colaboradores (2006) les permitieron identificar de 2 a 16 alelos como máximo en el genoma de *U. maydis*. En el presente trabajo fueron identificados de 3 a 20 alelos, siendo el marcador 1.86 el más polimórfico ya que identificó 20 variantes alélicas. Los marcadores 1.173 y 1.230 fueron los menos polimórficos con 3 alelos cada uno. Munkacsi y colaboradores (2006) incluyeron 36 aislamientos de *U. maydis*, de los cuales 12 son de USA, 12 de México y 12 de Sur América. Se observó que la longitud del repetido no predice el número de alelos, por ejemplo, el SSR 1.230 es el de mayor longitud y solo se encontraron 3 alelos, en el caso del SSR 1.221 fue el más corto y se encontraron 9 variantes alélicas. Lo anterior concuerda con el trabajo de Munkacsi y colaboradores (2006) ya que la longitud de la unidad repetida no guarda relación con el número de alelos. Cabe mencionar que el microsatélite 1.230 fue el menos frecuente en este análisis, esto posiblemente se debe a su longitud, ya que (Lim *et al.*, 2004) en su trabajo acerca de la comparación y abundancia de microsatélites en 14 genomas de hongos mencionan que las repeticiones en tándem largas son raras.

La mayor diversidad genética nuclear en *U. maydis* se encuentra dentro de poblaciones que corresponde al 83%, entre poblaciones corresponde al 13%. Esto reafirma que los altos porcentajes de diversidad genética mitocondrial y nuclear se deben a la alta recombinación del hongo en escalas geográficas pequeñas como lo han sugerido Zambino y colaboradores (1997), Valverde y colaboradores (2000) y Munkacsi y colaboradores (2006). Calderón-Fernández (2010) caracterizó molecularmente el huitlacoche *Ustilago maydis* D.C Corda, mediante ITS del DNA ribosomal, concuerda con el presente estudio, ya que al analizar 36

especímenes de huitlacoche obtenidos de 6 estados de México (Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Tlaxcala), menciona que la gran diversidad genética del hongo encontrada dentro de las poblaciones locales, puede atribuirse a las prácticas culturales llevadas a cabo en el centro de México, tales como la polinización cruzada entre aislamientos que se produce a varios kilómetros. Otro trabajo que concuerda con el presente análisis es el de Saleh *et al.*, (2006), en el que mediante análisis RAPD analizaron diez muestras de *U. maydis* pertenecientes a siete localidades diferentes de Egipto, reportan que la mayor diversidad genética se encuentra dentro de poblaciones que corresponde a 82.79%. El estadístico $F_{ST}=0.166$ indica que en las poblaciones de *U. maydis* existe una diferenciación genética grande. Esto concuerda parcialmente con el estudio de Munkacsi y colaboradores (2008), en el que para comparar los niveles de diferenciación genética entre 5 poblaciones de *U. maydis* pertenecientes a México, Sur América, y Estados Unidos, calcularon los valores R_{ST} con base en 10 loci SSRs. Ellos mencionan que existen altos niveles de diferenciación genética que corresponde a $R_{ST}>0.15$, y en la comparación entre México y Sur América reportan moderada diferenciación genética que corresponde a $R_{ST}=0.07$, esto se debe a que algunos aislamientos del hongo fueron obtenidos del ancestro *Z. mays ssp. mexicana* y del maíz que se desarrollaron en el mismo campo. El estadístico (NA) alelos diferentes indica que en los estados de Michoacán, Zacatecas y Jalisco, se encuentran los valores más altos que corresponden a 6.7, 5.8, y 5.0, respectivamente; en los estados de Querétaro, Tlaxcala y Campeche, se encuentran los valores más bajos 1.4, 1.6, y 1.7, respectivamente. En lo anterior se observó una relación entre el número de aislamientos estudiados con el número de alelos diferentes, ya que en el estado de Guanajuato se muestrearon 7 diferentes localidades y se encontró un valor de 3.4, y en el caso del estado de Tamaulipas se muestrearon 5 localidades y se encontró un valor mayor igual a 4.7. Tampoco se observó una relación entre el número de aislamientos y el número de alelos diferentes, por ejemplo, en el estado de Chiapas se incluyeron 18 aislamientos de 2 localidades, y se observó un menor número de alelos diferentes igual a 3.6, en el estado de Jalisco se incluyeron un número similar de aislamientos igual a 19 de 11 localidades, y el número de alelos diferentes corresponde a 5.0. La Heterocigosidad observada (H_o) promedio fue de 0.243, y la heterocigosidad esperada (H_e) promedio fue de 0.424, se observó que el estado de Michoacán presenta el valor más alto de $H_e=0.661$, esto indica que presenta el mayor número de alelos y por lo tanto también presentó

el mayor porcentaje de polimorfismo (100%); el estado de Tamaulipas también presentó un %P=100. El porcentaje de polimorfismo promedio en la presente investigación fue alto que corresponde a 74.29%; en el trabajo de Saleh y colaboradores (2006) reportan un %P=67.50, posiblemente este valor fue menor debido a que analizaron un número menor de muestras del hongo.

En los aislamientos de *U. maydis* analizados mediante SSRnu, se observó que el dendrograma con base en el método de Neighbor Joining formó dos grandes grupos principales denominados A y B. El grupo A se subdivide en A1, A2, A3 y A4. En el grupo A1 todos los aislamientos comparten los SSRnu 53, 68,73 y 249; interesantemente los aislamientos se aislaron de localidades a una altitud promedio de 1800 msn. En el grupo A2 los aislamientos de este conglomerado comparten el SSRnu 1.73 y 1.221, y provienen de una altitud promedio de 1685 msnm, excepto para los aislamientos de Tamaulipas. Los aislamientos del conglomerado A3 presentan los SSRnu 1.68 y 1.221, también se observó que la mayoría de los individuos fueron aislados de una altitud promedio de 1400 msnm, excepto los aislamientos colectados en Tamaulipas. Los aislamientos del grupo A4 comparten el SSRnu 1.221, en este conglomerado se agruparon aislamientos que están a nivel del mar, junto con los aislamientos provenientes de alturas hasta de 2565 msnm. El grupo B se subdivide en B1 y B2, en el grupo B1 los aislamientos presentan los SSRnu 1.68 y 1.95, los individuos de este subgrupo no se incluyeron con base en la altitud, ya que se encuentran desde 775 hasta 2565 msnm. El último conglomerado y más distante del dendrograma es el B2, la característica que comparten todos es la presencia de los SSRnu 1.68, 1.86, 1.95, 1.97, y 1.221, en este subgrupo tampoco se observó que los aislamientos se incluyeran con base en la altitud, ya que provienen de alturas que van desde 100 hasta 2020 msnm. El aislamiento más distante del dendrograma es el MICVEN1 se observó que este individuo presenta 8 SSRnu de los 10 microsatélites amplificados. Los aislamientos de *U. maydis* incluidos en este estudio no se agruparon con base en su sitio de colecta, lo cual puede deberse a varias razones: la domesticación del maíz, (Munckasi *et al.*, 2008), y su amplia distribución y diversificación en México (Bellon *et al.*, 2009), el flujo de genes es suficiente para mantener el polimorfismo de la virulencia del hongo en el maíz (Munckasi *et al.*, 2008), las prácticas agrícolas, procesos demográficos de *U. maydis* y la polinización cruzada debido a la distribución de campos a escala regional como lo ha sugerido Valverde y colaboradores (2000), trabajo en

el que mencionan que la mayor diversidad del hongo es en escalas locales, la migración de teliosporas por el viento llevando consigo otro tipo de variante alélica compatible (Christensen, 1963). El desarrollo de *U. maydis* en una amplia gama de altitudes que van desde 40 hasta 2565 msnm, así como a climas que van desde fríos hasta cálidos, indica la amplia adaptación del hongo como lo han sugerido Munckasi y colaboradores (2008). La inferencia de poblaciones mediante el algoritmo ΔK no solo corroboró que existen 2 agrupaciones, sino que también reafirma que tanto a nivel mitocondrial como nuclear la estructura óptima para el basidiomiceto es $K=2$, esto es similar al trabajo de Munckasi y colaboradores (2008) en el que mencionan que el análisis de estructura poblacional mostró evidencia de que en México existen dos poblaciones distintas a las que nombraron A-GT y MEX. En la primera población están incluidos 30 aislamientos obtenidos de *Zea mays ssp. Parviglumis* de Amates grande Guerrero, mientras que en la segunda población están incluidos 324 aislamientos de *U. maydis* obtenidos de maíz y teosinte de 14 campos. La prueba de Mantel mediante el coeficiente de correlación $R_{xy}=0.033$ indica que no existe correlación entre distancias genéticas con las geográficas, por ejemplo se hubiera esperado que todos los aislamientos del centro del país se agruparan, y que los individuos más lejanos por ejemplo los de Campeche y Chiapas formaran otro grupo, y no fue así. Lo anterior concuerda con el trabajo de Valverde y colaboradores (2000) en el que se observó que los aislamientos de Pachuca y Toluca son geográficamente más cercanos a los de Irapuato, pero genéticamente son más distantes, incluso que los aislados de Oaxaca. La diversidad genética dentro de las poblaciones de *U. maydis* y la heterocigosidad identificada a nivel nuclear y mitocondrial fueron similares, esto posiblemente se debe a que la molécula mitocondrial es altamente informativa como lo han sugerido Uribe y Khachatourians (2007) en su trabajo del hongo *Beauveria bassiana*, en el que reportan un alto grado de variabilidad genética a nivel mitocondrial del hongo, debido a los errores en la replicación, recombinación intermolecular, el sistema de reparación del DNAm, y los dímeros de la pirimidina no reparados. Es notable que los índices de diversidad genética del análisis con SSRmt y SSRnu son altamente similares. El 40% de los individuos incluidos en el análisis mitocondrial fueron utilizados en el estudio a nivel nuclear. Tomando esto en cuenta, el 35% de estos aislamientos pertenecen al conglomerado A reportado a nivel nuclear. Lo que sugiere que el estudio con SSRmt puede tener un mayor poder resolutivo. Sin embargo para establecer que tipo de análisis de

diversidad genética con SSR es más informativo (a nivel nuclear o mitocondrial), es necesario emplear los mismos aislamientos en ambos estudios.

Determinación de la distribución de las variantes alélicas del locus *b* en *U. maydis*

En el presente trabajo se analizaron 155 aislados, y fueron identificadas 12 variantes alélicas del locus *b* en la República Mexicana, de las cuales la *b7* fue la más frecuente, y las menos representadas fueron las variantes *b3* y *b18a*. Zambino y colaboradores (1997), analizaron un tamaño de muestra de 79 aislados del estado de Minnesota, USA; los alelos *b7* y *b5* fueron los más comunes, mientras que el alelo *b16* fue el menos frecuente. Saleh y colaboradores (2006) analizaron 78 aislados y reportan haber identificado 8 variantes alélicas (*b1*, *b2*, *b3*, *b4*, *b5*, *b6*, *b7* y *b8*) en 7 localidades de Egipto, a diferencia del presente estudio ellos identificaron con frecuencias iguales los alelos *b1*, *b3* y *b8*, siendo los alelos *b4* y *b6* los menos frecuentes, el único alelo que tiene en común este estudio con Saleh y colaboradores (2006) es el *b7*.

Relación entre la variante alélica *b* y la patogénesis de *U. maydis*.

De los dos métodos de inoculación (endógeno y exógeno) probados en invernadero, el método mediante picadura (endógeno) fue más efectivo que el método exógeno, ya que de 221 plantas inoculadas, el 61% presentaron los síntomas de la escala de severidad descrita en la metodología, en contraste con el 7.9% del otro método. Lo anterior ha sido reportado por Pataky y colaboradores (1995) y Vanegas y colaboradores (1995). Estos últimos mencionan que la inyección longitudinal a través de los estilos, inducen masivamente la producción del hongo. Se sugiere que el método exógeno no fue tan efectivo porque las células pudieron sufrir desecación debido a la temperatura en que fue desarrollado el experimento en invernadero fue de 36°C.

Los resultados del ensayo de patogénesis en campo, indican que el tratamiento 5 que presenta los alelos Tlamdo01 (a1b7) y Tlamdo02 (a2b17) indujo el mayor PI que corresponde al 28.75%, y el mayor rendimiento de huitlacoche que corresponde a 825.5g, este tratamiento fue más patógeno incluso que el control positivo FB1 y FB2. Con base en lo anterior se puede sugerir que existe una relación entre la variante alélica *b7* con la virulencia del hongo sobre la planta del maíz. Algunas razones que pueden explicar lo anterior son las siguientes:

Jiménez-Becerril., 2010 reporta que en el centro de la República Mexicana la variante alélica *b7* es la más frecuente, ocupando el 30% de 173 aislamientos de *U. maydis* analizados, por lo que posiblemente tienen la mayor capacidad de adaptación a una diversidad de altitudes y climas como lo han sugerido Munckasi y colaboradores (2008); así como la posible capacidad de infectar más eficientemente al maíz. Según la ficha técnica del híbrido AZ-60 Asgrow muestra cierta resistencia a la infección de *U. maydis*, a pesar de esa característica es notable que la cepa con esa variante alelica haya sido más virulenta. En el trabajo de Valdez *et al.* (2009), sugieren que la variedad de maíz debe ser susceptible al hongo ya que al evaluar 15 maíces criollos para la inducción de huitlacoche, se observó un cierto efecto del material genético de maíz utilizado sobre la cobertura de la mazorca y el rendimiento del huitlacoche, el material Criollo de Lomas de Cabras es el más recomendable para llevar a cabo la producción de huitlacoche en el bajío. Otro de los factores principales que pudo influir negativamente en el desarrollo del hongo fue el clima, ya que en el estado de Tlaxcala desde que se inocularon las cepas hasta que se levantaron los datos, la temperatura promedio fue de 23°C como máximo y mínimas de 10°C, aunado a que fueron días lluviosos. Villanueva *et al.* (2007) han sugerido que el desarrollo del huitlacoche en maíz que se cultiva a cielo abierto durante temporada de lluvias, influye negativamente en la obtención del hongo. Otro de los factores que influye negativamente en el crecimiento de *U. maydis* es la etapa del jilote como lo han sugerido Pataky y Chandler (2003), posiblemente este factor influyó en el actual trabajo debido a que se inoculó cuando los jilotes presentaron una longitud promedio de 6-10 cm. Por cuestiones de practicidad se inoculó sólo en la parte media de la planta, esto se hizo con el objetivo de que el hongo pudiera desarrollarse hacia arriba y debajo de la planta, y de esta manera invadirla toda, el hecho de inocular en un solo punto pudo influir de manera negativa, ya que Villanueva *et al.* (2007) y Madrigal *et al.* (2010) al inocular las cepas a una concentración de 1×10^6 cel/mL en tres puntos equidistantes de la planta del maíz obtuvieron un rendimiento de hongo por planta igual a 0.02 kg.

La producción de huitlacoche de manera artificial y/o a campo abierto se ha enfrentado a diversos factores como se mencionó anteriormente, la mayoría de las investigaciones están enfocadas en la susceptibilidad de variedades de maíz, métodos de producción de inóculo, formas de inoculación, regiones geográficas de recolección etc., pero nulos trabajos se han enfocado en el estudio del locus *b* de *U. maydis*, siendo este uno de los controladores

moleculares principales de la patogénesis del hongo en la planta, por lo tanto este tipo de estudios puede ayudar a complementar los antecedentes que se tienen para la obtención de altos rendimientos del huitlacoche.

IX CONCLUSIONES

Existen 5 microsatélites imperfectos distribuidos en regiones intergénicas del DNA mitocondrial de *U. maydis*. El análisis de la diversidad genética mitocondrial y nuclear permitió estimar que la mayor diversidad se encuentra dentro de las poblaciones de *U. maydis*.

Las variantes alélicas identificadas en el presente estudio fueron *b7*, *b14*, *b15*, *b19*, *b18*, *b1*, *b17*, *b11*, *b13*, *b9*, *b18a*, y *b3*, siendo la *b7* la más frecuente.

Existe una correlación entre la variante alélica (*b7*) y la patogénesis en plantas de maíz.

X BIBLIOGRAFÍA

Agarwal MN, Shrivastava HP. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27: 617-631.

Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK. et al. *Theor Appl Genet* (2007) 114: 359.

Agrios GN. (2006). *Fitopatología*. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México, D. F.

Aguayo DJ, Acosta M, Pérez LE, Guevara F, García AM. (2016). Producción natural de huitlacoche [*Ustilago maydis* (DC) Corda] en el estado de Aguascalientes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7: 1043-1050.

Aranguren JA, Román R., Isea W, Villasmil Y, Jordana J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).

Banuett F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight, *Tig Trends In Genetics* May, 8: 174-180.

Banuett F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual Review Genetics*, 29: 179-208.

Barnes CW, Les J. Szabo, Georgina May, James V. Grotg. (2004). Inbreeding levels of two *Ustilago maydis* populations. *Mycology*, 96: 1236-1244.

Beas F, Loarca R, Guzmán G, Rodríguez SH, Vasco NL, Guevara F. (2011). Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona centro de México. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42:36-44.

Benson G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 27: 573-580.

Burd M. (2009). Adaptation and constraint: over view *Encyclopedia of Life Sciences*.[http://www.els.net\[01/abr/2015\]](http://www.els.net[01/abr/2015]).

Calderón ML. (2010). Caracterización clásica y molecular del huitlacoche [*Ustilago maydis* DC (Corda)], hongo de importancia social y económica en la región central de México.

Carreño DO, Sandoval C, Lolas M. (2012). Evaluación in vitro E in vivo del efecto de distintos fungicidas sobre la germinación de teliosporas de *Ustilago maydis*, agente causal del carbón común del maíz.

Castelo AT, Wellington M, Gao GR. (2002). TROLL - Tandem Repeat Occurrence Locator. *Bioinformatics Applications Note*. 18:634-636.

Cheng HH, Crittenden LB. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci*. 73:539-546.

Christensen JJ. (1963). Corn Smut Caused by *Ustilago maydis*. The American Phytopathology Society. Monograph. 2:1-41.

Clark-walker GD. (1992). Evolution of mitochondrial genomes in fungi. *Int. Rev. Cytol*. 141:89-127.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (2008) 'Provincias biogeográficas de México'.

Croll D, Wille L, Gamper HA, Natarajan M, Lammers PJ, Corradi N, Sanders IR. (2008). Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and

mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 178:672-687.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W., Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS, Dobrovolski R, Landeiro VL, de Campos Telles MP, Rangel TF, Bini LM. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology.* 36: 475-485.

Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 5:435-445.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of cluster of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked *loci* and correlated allele frequencies. *Genetics.* 164: 1567-1587.

González JM, Domínguez A, Rosas R, Cervantes JA, Ruiz J. (2004). Isolation and molecular analysis of Umhda2 a gene encoding a histone deacetylase from *Ustilago maydis*. *DNA Seq.* 15:44-50.

Hoffman CS, Wriston F. (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57: 267-272.

Infostat, versión 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Juárez M, Ruiloba S, Chávez G, Hernández C, Villa L. (2011). Huitlacoche (*corn smut*), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología.* 28: 69-73.

Karaoglu H, Ying Lee CM and Meyer W. (2005). Survey of Simple Sequence Repeats in Completed Fungal Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 639-649.

Klosterman, SJ, Perlin MH, Garcia-Pedrajas M, Covert SF, Gold SE. (2007). Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Advances in genetics*. 57:1-47.

Kuntal H , Sharma V, Henry D. (2012). Microsatellite analysis in organelle genomes of Chlophyta. *Bioinformatics*. 8:255-259.

Leclercq S, Rivals E, and Jarne P. (2010). DNA Slippage Occurs a Microsatellite Loci without Minimal Threshold Length in Humans: A Comparative Genomic Approach. *Genome Biology and Evolution*, 2:325-335.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11: 2453-2465.

Lim S, Notley-McRobb L, Lim M, Carter DA. (2004). A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal Genetics and Biology*. 41:1025-1036.

Mahfooz S , Singh P, Maurya DK, Yadav MC, Azram T, Sahay H, Srivastava A, Anil P. (2012). Microsatellite repeat dynamics in mitochondrial genomes of phytopathogenic fungi: frequency and distribution in the genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 8:1171-1175.

Madrigal J, Villanueva C, Sahagún J, Acosta M, Martínez L y Espinoza T. (2010). Production test of green house hydroponic huitlacoche (*Ustilago maydis* cda.) *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16: 177-182.

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sánchez J, Buckler E, Doebley J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Evolution*

Mittal N, Dubey. (2009). Microsatellite markers- A new practice of DNA based markers in molecular genetics. *Phcog Rev.* 3:235-46.

Munkacsi AB, Kawakami S, Pan JJ, Lee K, Stoxen S, Hang J and May G. (2006). Genome-Wide assessment of tandem repeat markers for biogeographical analyses of the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Molecular Ecology Notes.* 6:221-223.

Munkacsi AB, Stoxen S, May G. (2008). *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. *Proc R Soc B.* 275:1037-1046.

Muñoz A. 2005. Centli Maíz. OCP México.

Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA. (2006). El huitlacoche: exquisitez culinaria mexicana con altas propiedades nutraceuticas. (Eds.). *Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericana* (p: 75). Primera edición. México: Fondo de Cultura Económica.

Parida SK, Dalal V, Singh AK, Singh NK, Mohapatra T. (2009) Genic non-coding microsatellites in the rice genome: characterization, marker design and use in assessing genetic and evolutionary relationships among domesticated groups. *BMC Genomics.* 10:140

Pataky JK, y Kerns MR. (1995). "Evaluation of a Silk-Inoculation Technique to Differentiate Reactions of Sweet Corn Hybrids to Common Smut". *Phytopathology.* 85:1323-1328.

Pataky j K, Chandler MA. (2003). Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*: timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia.* 95:1261–1270.

Peakall R y Smouse PE. 2014. Software Genlex 6.5. Disponible en <http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlex/Welcome.html>.

Perrier X, Jacquemoud JP. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/.darwin>

Pimentel-González DJ, Rodríguez-Huezo ME, Campos-Montiel RG, Trapala-Islas A nombre articulo Hernández-Fuentes AD. (2011). Revista Mexicana de Ingeniería Química. 10: 171-178.

Piñero D, *et al.* (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

Rajwant KK, Manoj KR, Sanjay K, Rohtas S, Dhawan AD. (2011). Microsatellite marker: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177:309-334.

Ruíz (2008). *Revista Electrónica Nova Scientia*. 1:118-135.

Saleh FM, El-Defrawy MM, Abdou.RF, Mohammed AF. (2006). Genetic Variability at The b-Mating Type Locus In *Ustilago maydis* In Egypt and its Molecular Identification, *Assiut Journal of Agricultural Science*. 37: 153-170.

Sehgal D, Rajpal VR, Raina SN. (2008). Chloroplast DNA diversity reveals the contribution of two wild species to the origin and evolution of diploid safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genome*. 51: 638-643.

Sia EA, Butler CA, Dominska M, Greenwell P, Fox TD, Petes TD. (2000). Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*. 97: 250-255.

Sunnucks P. (2001). Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, 15: 199-203.

Trivedi S. (2006). Comparison of simple sequence repeats in 19 Archaea. *Genet Mol Res.* 5:741-772.

Uribe D, Khachatourians G. (2007). Análisis y aplicaciones de la tipificación molecular del genoma mitocondrial de *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana de Entomología.* 33(2), 89-97.

Valdez M, Valverde ME, Paredes O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche SinnCo.

Valverde ME, Vandemark GJ, Paredes-Lopez O. (2000). Genetic diversity of *Ustilago maydis* strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 16: 49-55.

Vanegas PE, Valverde ME, Paredes-López O, Pataky JK. (1995). “Production of the Edible Fungus Huitlacoche (*Ustilago maydis*) Effect of Maize Genotype on Chemical Composition”. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 80:104-106.

Villanueva VC, Sánchez RE, Villanueva SE. (2007). El huitlacoche y su cultivo. Ed. Mundi Prensa, México. 96 p.

Wahl R, Zahiri A, Kämper J. (2010). The *Ustilago maydis* b mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Molecular Microbiology.* 75: 208-220.

Wang ML, Barkley NA, Jenkins TM. (2009). Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology. *G3.* 3:54-67.

Weber JL. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7:524–530.

Wright S. (1965). The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*. 19: 395-420.

Zambino P, Groth JV, Lukens L, Garton JR, May G. (1997). Variation at the b Mating Type Locus of *Ustilago maydis*. *Ecology and Population Biology*. 87: 1233-1239.

Zhan J, Pettway RE, McDonald BA. (2002). The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genet Biol*. 38:286-297.

1.221

F 17899745-17899763

CCGTCGTAATCGCACAGATCTTATGAGAAGGCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGC
TTTTTGTGTTGGTTGATATGCAAATGAGAAGATGGTATACTGGTACAAATGTG
ATGCTTTTCGGGGATGGCGAAAA R 17899820-17899843

1.249

F 19471413-19471432

CAAGACTCGAAGCGACACAGAGACCAACGAACCCTGATCCGGACCCCGTCTCG
CCCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTCTCTTTCTTCTCTGCCTTTGCCT
TTGCCATTACGATTCACGA 19471505-19471524

1.121

F10751453-10751472

GCAGTCGGCTAACAACTCAGACTAAGTTGATCACGAATCGTGAATCGTGAAT
CGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGA
AATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATC
GTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGA
ATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCGTGA
GACGTTAAGTTACTCGCAGATGCAGACTCGCCG

R 10751721-10751741 FE 289

F1.97 16483110-16483129

CACGAATGACACCTTGCACTAGCAATCACGATTCACGATTCACGATTCACGATT
CACGATTCACGATTCACGATTCACGATTCACGATTCACGATTCACGATTCACGATT
TTTCACAATGGGATCATGAAGGACTGTACAAGCACGAAGTTCTGATCCGCCTG
AATGGTTTG R 16483234-16483254

F 1.95 16405271-16405288

CGAATCGCTGTGCAACATGTCGAACGCGAGCAGCAACAGCAACAGCAACAGCA
ACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAG
CAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAG
GTGACGGCGAATTCTT R 16405412-16405430

1.230

CTCTTCCAAGCTCGCCACTCGCTACGATGGCGACATCA TTGACGAGACCAATGC
TGCCCTCAAGGACC TTGGCCTGAAGAAGCGCTACGATGGCGACATCA TTGACG
AGACGAATGCTGCCCTCAAGGACC TTGGCCTGAAGAAGCGCTACGATGGCGAC
ATCA TTGACGAGACCAATGCTGCCCTCAAGGACC TTGGCCTGAAGAAGCGCTA
CGATGGCGACATCA TTGACAAGACCAATGCTGCCCTCAAGGACC TTGGCCTGA
AGAAGCGCTACGATGGCGACATCA TTGACGAGACCAATGCTGCCCTCAAGGAC
C TTGGCCTGAAGAAGCGCTACGATGGCGACATCA TTGACGAGACCAATGCTGC
CCCTCAAGGACC TTGGCCTGAAGAAGCGCTACGATGGCGACATCA TTGACGAGA
CGAATGCTGCCCTCAAGGACC TTGGCCTGAAGAAGCGCTACGATGGCGACATC
A TTGACGAGACGAATGCTGCCCTCAAGGACC TTGGCCTGAAGAAGCGCTACGA
GGT GATGACTT GATGAGATCAATGGCTGCCT

Anexo 2

Variantes alélicas de los microsatélites mitocondriales identificados en los 47 aislamientos de *U. maydis*.

| Estado | ID | SSRMUM1 (bp) | SSRMUM2 (bp) | SSRMUM3 (bp) | SSRMUM4 (bp) | SSRMUM5 (bp) |
|------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Tamaulipas | TAMSAN01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | TAMRNV03 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | TAMRNV021 | 0 | 180 | 281 | 162 | 181 |
| | TAMRNV02 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Chiapas | CHICHI21 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | CHICHI07 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | CHICHI03 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | CHIRCH01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | CHIRCH03 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | CHIRVI | 0 | 180 | 277 | 168 | 0 |
| Jalisco | JALHOS01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | JALMAG01 | 181 | 180 | 277 | 156 | 181 |
| | JALCUA01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | JALGRU01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | JALAUT02 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | JALAUT01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | JALAUT011 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Tlaxcala | TLAHUA05 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | TLAHUA04 | 177 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | TLAHUA07 | 181 | 0 | 277 | 162 | 181 |
| Puebla | PUEESP01 | 177 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | PUESEB05 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Zacatecas | ZACJUL03 | 0 | 180 | 277 | 162 | 187 |
| | ZACJUC03 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | ZACJAL04 | 181 | 180 | 277 | 166 | 181 |
| | ZACAPO03 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | ZACVIL05 | 0 | 180 | 277 | 162 | 187 |
| | ZACVIL03 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |

| | | | | | | |
|------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | ZACVIL02 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Hidalgo | HIDTEO12 | 181 | 180 | 281 | 162 | 181 |
| | HIDTEO15 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | HIDTEO07 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Hidalgo | HIDPRO09 | 0 | 180 | 277 | 162 | 187 |
| | HIDPRO03 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | HIDPRO07 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Guanajuato | GTOIRA02 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | GTOMIL01 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | GTOMIL011 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | GTOSPZ02 | 181 | 180 | 277 | 152 | 181 |
| | GTOSPZ03 | 181 | 180 | 277 | 152 | 181 |
| | GTOSPZ020 | 0 | 180 | 277 | 152 | 181 |
| | GTODOL01 | 0 | 180 | 277 | 162 | 0 |
| | GTOTEM07 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | GTOHAC02 | 0 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| Michoacán | MICQRO05 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | MICQRO09 | 181 | 0 | 277 | 162 | 181 |
| Querétaro | QROCAD01 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |
| | QROCAM01 | 181 | 180 | 277 | 162 | 181 |

Anexo 3

Variantes alélicas de los SSR nucleares identificados en 155 aislamientos de *U. maydis* de la Republica Mexicana.

| No. De aislamiento | Clave | loci53 | loci53 | loci68 | loci68 | loci73 | loci73 | loci86 | loci86 | loci95 | loci95 |
|--------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | TAMRB1 | 160 | 160 | 82 | 82 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | TAMRB2 | 148 | 148 | 113 | 82 | 77 | 77 | 129 | 120 | 120 | 0 |
| 3 | TAMRB3 | 153 | 153 | 121 | 121 | 77 | 77 | 129 | 120 | 92 | 92 |
| 4 | TAMRB4 | 139 | 139 | 82 | 82 | 77 | 77 | 129 | 120 | 92 | 92 |
| 5 | TAMRB5 | 139 | 139 | 126 | 94 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | TAMRNV1 | 150 | 150 | 126 | 82 | 77 | 77 | 129 | 120 | 0 | 0 |
| 7 | TAMPRO1 | 148 | 148 | 102 | 102 | 77 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 8 | TAMRNV2 | 142 | 142 | 93 | 93 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | TAMPRO2 | 148 | 148 | 102 | 102 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | TAMPRO3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | TAMPRO4 | 148 | 148 | 102 | 102 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 12 | TAMPRO5 | 145 | 145 | 102 | 81 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 13 | TAMRIV1 | 139 | 139 | 113 | 113 | 77 | 77 | 109 | 103 | 0 | 0 |
| 14 | TAMSAN1 | 139 | 139 | 93 | 93 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 97 |
| 15 | CHICHI1 | 139 | 139 | 88 | 88 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 97 |
| 16 | CHICHI2 | 139 | 139 | 88 | 88 | 86 | 86 | 0 | 0 | 97 | 92 |
| 17 | CHICHI3 | 139 | 139 | 88 | 88 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 92 |
| 18 | CHIRCH1 | 148 | 139 | 113 | 113 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 97 |
| 19 | CHICHI4 | 0 | 0 | 88 | 88 | 77 | 77 | 0 | 0 | 97 | 97 |
| 20 | CHICHI5 | 142 | 142 | 102 | 102 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | CHICHI6 | 139 | 139 | 88 | 88 | 0 | 0 | 122 | 114 | 97 | 97 |
| 22 | CHICHI7 | 142 | 142 | 82 | 82 | 77 | 77 | 127 | 119 | 97 | 97 |
| 23 | CHICHI8 | 139 | 139 | 88 | 88 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 97 |
| 24 | CHICHI9 | 145 | 139 | 88 | 88 | 0 | 0 | 122 | 114 | 97 | 97 |
| 25 | CHICHI10 | 142 | 142 | 82 | 82 | 77 | 77 | 0 | 0 | 97 | 97 |
| 26 | CHICHI11 | 142 | 142 | 102 | 82 | 77 | 77 | 129 | 122 | 0 | 0 |
| 27 | CHICHI12 | 142 | 142 | 82 | 82 | 77 | 77 | 125 | 116 | 0 | 0 |
| 28 | CHIRCH2 | 139 | 139 | 88 | 88 | 77 | 77 | 127 | 119 | 92 | 92 |
| 29 | CHIRCH3 | 139 | 139 | 107 | 88 | 77 | 77 | 122 | 114 | 92 | 92 |
| 30 | CHICHI13 | 139 | 139 | 102 | 102 | 77 | 77 | 127 | 119 | 0 | 0 |
| 31 | CHICHI14 | 139 | 139 | 82 | 82 | 77 | 77 | 129 | 122 | 0 | 0 |
| 32 | CHICHI15 | 139 | 139 | 88 | 88 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 92 |
| 33 | GTOTEM1 | 142 | 142 | 82 | 82 | 0 | 0 | 125 | 116 | 97 | 92 |
| 34 | GTOTOM1 | 148 | 148 | 107 | 69 | 77 | 77 | 0 | 0 | 97 | 92 |
| 35 | GTOCUE1 | 148 | 148 | 107 | 69 | 77 | 77 | 98 | 93 | 97 | 92 |
| 36 | GTOSPZ1 | 148 | 148 | 82 | 82 | 86 | 86 | 122 | 114 | 97 | 92 |

| | | | | | | | | | | | |
|----|----------|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|----|----|
| 37 | GTOSPZ2 | 148 | 148 | 82 | 82 | 86 | 86 | 122 | 114 | 92 | 92 |
| 38 | GTOVIC1 | 145 | 145 | 102 | 102 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 39 | GTOTEM2 | 142 | 142 | 82 | 82 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 40 | GTOSPZ3 | 148 | 148 | 69 | 69 | 77 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 41 | GTOIRA1 | 148 | 148 | 102 | 102 | 0 | 0 | 122 | 114 | 92 | 92 |
| 42 | GTODOL1 | 148 | 148 | 69 | 69 | 86 | 86 | 122 | 114 | 92 | 92 |
| 43 | GTOIRA2 | 128 | 128 | 102 | 69 | 86 | 86 | 122 | 114 | 92 | 92 |
| 44 | GTOTEM3 | 148 | 148 | 82 | 82 | 77 | 77 | 122 | 114 | 97 | 92 |
| 45 | GTODOL1 | 142 | 142 | 102 | 102 | 86 | 86 | 127 | 119 | 97 | 92 |
| 46 | GTOTOM2 | 150 | 145 | 102 | 69 | 86 | 86 | 0 | 0 | 97 | 92 |
| 47 | HIDTEO1 | 145 | 145 | 102 | 69 | 77 | 77 | 109 | 103 | 97 | 92 |
| 48 | HIDPRO1 | 128 | 128 | 82 | 82 | 77 | 77 | 127 | 119 | 92 | 92 |
| 49 | HIDPRO2 | 142 | 142 | 82 | 82 | 77 | 77 | 109 | 103 | 92 | 92 |
| 50 | HIDTEO2 | 142 | 142 | 102 | 102 | 77 | 77 | 127 | 119 | 92 | 92 |
| 51 | HIDPRO3 | 142 | 142 | 69 | 69 | 86 | 86 | 127 | 119 | 92 | 92 |
| 52 | HIDTEO3 | 148 | 148 | 102 | 82 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 53 | HIDTEO4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 77 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 54 | HIDTEO5 | 145 | 145 | 82 | 82 | 86 | 86 | 127 | 119 | 0 | 0 |
| 55 | HIDTEO6 | 142 | 142 | 102 | 102 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 56 | HIDCRU1 | 142 | 142 | 0 | 0 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 57 | HIDTEO7 | 131 | 131 | 82 | 82 | 77 | 77 | 103 | 97 | 92 | 92 |
| 58 | HIDTEO8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 59 | HIDTEO9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 60 | HIDTEO10 | 142 | 142 | 102 | 69 | 86 | 86 | 115 | 108 | 0 | 0 |
| 61 | HIDTEO11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 62 | HIDCRU2 | 142 | 142 | 102 | 82 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 63 | OAXUZA1 | 145 | 140 | 93 | 93 | 86 | 86 | 103 | 96 | 92 | 92 |
| 64 | OAXUZA2 | 145 | 140 | 93 | 82 | 77 | 77 | 111 | 104 | 92 | 92 |
| 65 | OAXVIL1 | 142 | 142 | 102 | 82 | 77 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 66 | OAXVIL2 | 142 | 142 | 102 | 102 | 77 | 77 | 131 | 122 | 92 | 92 |
| 67 | OAXUZA3 | 0 | 0 | 93 | 93 | 77 | 77 | 103 | 96 | 92 | 92 |
| 68 | OAXSAN1 | 148 | 148 | 102 | 102 | 77 | 77 | 125 | 116 | 0 | 0 |
| 69 | JALPAZ1 | 142 | 142 | 113 | 113 | 77 | 77 | 103 | 96 | 92 | 92 |
| 70 | JALSAU1 | 131 | 134 | 82 | 82 | 77 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 71 | JALUNI1 | 131 | 131 | 82 | 82 | 77 | 77 | 0 | 0 | 97 | 97 |
| 72 | JALPAL1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 77 | 77 | 0 | 0 | 97 | 97 |
| 73 | JALRAN1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 77 | 0 | 0 | 97 | 97 |
| 75 | JALGRU1 | 142 | 142 | 0 | 0 | 86 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 76 | JALTEQ1 | 136 | 136 | 82 | 82 | 77 | 77 | 127 | 119 | 0 | 0 |
| 77 | JALGRU2 | 131 | 131 | 102 | 102 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 78 | JALMAG1 | 148 | 148 | 121 | 121 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 79 | JALCOC1 | 145 | 145 | 82 | 82 | 86 | 86 | 115 | 108 | 92 | 92 |
| 80 | JALCUA1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 86 | 127 | 119 | 92 | 92 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| 81 | JALPAL2 | 139 | 139 | 88 | 88 | 86 | 86 | 122 | 114 | 0 | 0 |
| 82 | JALCUA2 | 132 | 132 | 107 | 82 | 77 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 83 | JALHAS1 | 132 | 132 | 82 | 82 | 93 | 93 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 84 | JALCUA3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 85 | JALUNI2 | 131 | 131 | 82 | 82 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 86 | JALCOC2 | 145 | 145 | 107 | 107 | 77 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 87 | JALBAL1 | 139 | 139 | 0 | 0 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 88 | JALSAN1 | 148 | 148 | 69 | 69 | 77 | 77 | 127 | 119 | 0 | 0 |
| 89 | TLAXTLA1 | 0 | 0 | 88 | 88 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 90 | TLAXTLA2 | 125 | 125 | 82 | 82 | 0 | 0 | 117 | 110 | 0 | 0 |
| 91 | TLAXTLA3 | 148 | 148 | 0 | 0 | 86 | 86 | 116 | 110 | 0 | 0 |
| 93 | NAYIXT1 | 136 | 136 | 69 | 69 | 86 | 77 | 122 | 113 | 92 | 92 |
| 94 | NAYBAL1 | 125 | 125 | 0 | 0 | 86 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 95 | NAYIXT2 | 0 | 0 | 102 | 77 | 86 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 96 | ZACJUC1 | 128 | 128 | 82 | 82 | 86 | 77 | 120 | 102 | 92 | 92 |
| 97 | ZACMOY1 | 121 | 121 | 126 | 82 | 86 | 77 | 139 | 119 | 92 | 92 |
| 98 | ZACJUC2 | 0 | 0 | 69 | 69 | 0 | 0 | 122 | 103 | 92 | 92 |
| 99 | ZACVIL1 | 131 | 131 | 93 | 82 | 0 | 0 | 132 | 113 | 92 | 92 |
| 100 | ZACAPO1 | 0 | 0 | 82 | 82 | 0 | 0 | 148 | 125 | 92 | 76 |
| 101 | ZACFEL1 | 0 | 0 | 107 | 82 | 0 | 0 | 113 | 96 | 92 | 92 |
| 102 | ZACAPO2 | 136 | 136 | 126 | 82 | 86 | 86 | 128 | 110 | 92 | 76 |
| 103 | ZACOJO1 | 0 | 0 | 82 | 82 | 86 | 77 | 125 | 107 | 92 | 92 |
| 104 | ZACOJO2 | 0 | 0 | 82 | 82 | 86 | 77 | 122 | 105 | 122 | 92 |
| 105 | ZACMOY2 | 142 | 142 | 93 | 93 | 86 | 77 | 129 | 111 | 92 | 92 |
| 106 | ZACJAL1 | 121 | 121 | 82 | 82 | 86 | 86 | 0 | 0 | 122 | 92 |
| 107 | ZACJAL2 | 134 | 134 | 93 | 93 | 86 | 86 | 0 | 0 | 122 | 92 |
| 108 | ZACMOY3 | 167 | 125 | 126 | 82 | 86 | 77 | 142 | 122 | 92 | 92 |
| 109 | ZACMOY4 | 136 | 136 | 82 | 82 | 86 | 86 | 109 | 95 | 92 | 92 |
| 110 | ZACFEL2 | 136 | 136 | 82 | 82 | 86 | 77 | 113 | 98 | 92 | 92 |
| 111 | QROCAD1 | 0 | 0 | 93 | 93 | 86 | 77 | 125 | 110 | 122 | 122 |
| 112 | QROCAD2 | 137 | 137 | 93 | 93 | 86 | 77 | 125 | 107 | 122 | 122 |
| 113 | PUESEB1 | 139 | 139 | 82 | 82 | 0 | 0 | 109 | 94 | 97 | 97 |
| 114 | PUESEB2 | 139 | 139 | 82 | 82 | 0 | 0 | 110 | 94 | 92 | 92 |
| 115 | PUESEB3 | 139 | 139 | 93 | 93 | 0 | 0 | 111 | 94 | 92 | 92 |
| 116 | PUESER1 | 151 | 125 | 88 | 82 | 0 | 0 | 109 | 94 | 0 | 0 |
| 117 | PUECTA1 | 155 | 155 | 121 | 121 | 0 | 0 | 122 | 104 | 0 | 0 |
| 118 | PUESER2 | 145 | 145 | 121 | 121 | 86 | 77 | 152 | 131 | 92 | 92 |
| 119 | PUESEB4 | 139 | 139 | 82 | 82 | 86 | 86 | 122 | 103 | 92 | 92 |
| 120 | PUEESP1 | 0 | 0 | 82 | 82 | 86 | 86 | 113 | 96 | 116 | 116 |
| 121 | MICQRO1 | 148 | 148 | 77 | 77 | 86 | 86 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 122 | MICTZIO1 | 167 | 125 | 93 | 93 | 86 | 86 | 133 | 115 | 116 | 116 |
| 123 | MICHPUR1 | 139 | 139 | 69 | 69 | 86 | 86 | 120 | 102 | 103 | 92 |
| 124 | MICORG1 | 131 | 131 | 82 | 82 | 0 | 0 | 133 | 113 | 92 | 92 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| 125 | MICPUR2 | 139 | 139 | 69 | 69 | 0 | 0 | 133 | 113 | 103 | 92 |
| 126 | MICTUZ1 | 139 | 139 | 82 | 82 | 0 | 0 | 133 | 113 | 92 | 92 |
| 127 | MICORG2 | 139 | 139 | 82 | 82 | 0 | 0 | 122 | 105 | 116 | 116 |
| 128 | MICHA1 | 167 | 125 | 82 | 82 | 0 | 0 | 125 | 107 | 92 | 92 |
| 129 | MICJAL1 | 139 | 139 | 113 | 113 | 0 | 0 | 156 | 135 | 103 | 103 |
| 130 | MICVEN1 | 148 | 148 | 82 | 69 | 0 | 0 | 133 | 113 | 122 | 92 |
| 131 | MICPAS1 | 139 | 139 | 69 | 69 | 93 | 93 | 129 | 111 | 92 | 92 |
| 132 | MICVEN2 | 139 | 139 | 88 | 88 | 93 | 93 | 99 | 88 | 116 | 116 |
| 133 | MICTZIO2 | 142 | 142 | 77 | 77 | 93 | 93 | 0 | 0 | 103 | 103 |
| 134 | MICPAS2 | 142 | 142 | 88 | 88 | 93 | 77 | 0 | 0 | 103 | 103 |
| 135 | MICCHA2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 122 | 106 | 0 | 0 |
| 136 | MICHA3 | 139 | 139 | 88 | 88 | 0 | 0 | 0 | 0 | 122 | 122 |
| 137 | MICQRO2 | 142 | 142 | 107 | 107 | 93 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 138 | MICQRO3 | 167 | 167 | 0 | 0 | 0 | 0 | 137 | 118 | 0 | 0 |
| 139 | MICMOR1 | 142 | 142 | 82 | 82 | 86 | 77 | 0 | 0 | 92 | 92 |
| 140 | MICQRO4 | 167 | 167 | 82 | 82 | 0 | 0 | 120 | 103 | 0 | 0 |
| 141 | MICQRO5 | 167 | 167 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 142 | EDOPLA1 | 142 | 142 | 102 | 102 | 86 | 77 | 0 | 0 | 97 | 97 |
| 143 | EDOAME1 | 142 | 142 | 102 | 102 | 86 | 86 | 119 | 104 | 122 | 92 |
| 144 | EDOZUL1 | 142 | 142 | 82 | 82 | 86 | 86 | 117 | 101 | 103 | 103 |
| 145 | EDOPLA2 | 142 | 142 | 82 | 82 | 86 | 86 | 117 | 101 | 116 | 97 |
| 146 | EDOZUL2 | 142 | 142 | 82 | 69 | 0 | 0 | 117 | 117 | 92 | 92 |
| 147 | EDOZUL3 | 135 | 135 | 82 | 82 | 86 | 77 | 133 | 115 | 92 | 92 |
| 148 | EDOZUL4 | 142 | 142 | 69 | 69 | 86 | 86 | 117 | 101 | 0 | 0 |
| 149 | CAMPTAB1 | 142 | 142 | 77 | 77 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 150 | CAMPTAB2 | 142 | 142 | 88 | 88 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 151 | CAMPTAB3 | 0 | 0 | 77 | 77 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 152 | CAMPTAB4 | 0 | 0 | 121 | 121 | 86 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 153 | CAMPTAB5 | 139 | 139 | 0 | 0 | 86 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 154 | CAMPTAB6 | 139 | 139 | 88 | 88 | 86 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 155 | CAMPTAB7 | 139 | 139 | 88 | 88 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 156 | CAMPTAB8 | 139 | 139 | 102 | 102 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 157 | CAMPTAB9 | 112 | 112 | 77 | 77 | 0 | 0 | 122 | 122 | 0 | 0 |

| No. De aislamiento | Clave | loci97 | loci97 | loci121 | loci121 | loci221 | loci221 | loci230 | loci230 | loci249 | loci249 |
|--------------------|---------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | TAMRB1 | 87 | 87 | 294 | 294 | 106 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 2 | TAMRB2 | 101 | 101 | 241 | 241 | 111 | 111 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | TAMRB3 | 101 | 101 | 307 | 241 | 111 | 111 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | TAMRB4 | 87 | 87 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 5 | TAMRB5 | 101 | 101 | 241 | 241 | 106 | 106 | 0 | 0 | 123 | 123 |
| 6 | TAMRNV1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 114 | 114 |
| 7 | TAMPRO1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 594 | 594 | 109 | 109 |
| 8 | TAMRNV2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 114 | 106 | 0 | 0 | 123 | 123 |
| 9 | TAMPRO2 | 90 | 90 | 0 | 0 | 114 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 10 | TAMPRO3 | 0 | 0 | 246 | 246 | 114 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | TAMPRO4 | 87 | 87 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 109 | 109 |
| 12 | TAMPRO5 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 13 | TAMRIV1 | 105 | 105 | 0 | 0 | 106 | 106 | 602 | 602 | 0 | 0 |
| 14 | TAMSAN1 | 105 | 105 | 302 | 302 | 106 | 98 | 594 | 594 | 112 | 112 |
| 15 | CHICH1 | 90 | 90 | 302 | 302 | 106 | 98 | 0 | 0 | 96 | 96 |
| 16 | CHICH2 | 97 | 97 | 0 | 0 | 106 | 98 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 17 | CHICH3 | 97 | 97 | 0 | 0 | 106 | 98 | 602 | 602 | 112 | 112 |
| 18 | CHIRCH1 | 105 | 105 | 307 | 307 | 106 | 106 | 602 | 602 | 96 | 96 |
| 19 | CHICH4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 20 | CHICH5 | 97 | 97 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 96 | 96 |
| 21 | CHICH6 | 90 | 90 | 307 | 307 | 127 | 127 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 22 | CHICH7 | 97 | 97 | 0 | 0 | 127 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 23 | CHICH8 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 24 | CHICH9 | 90 | 90 | 307 | 307 | 106 | 106 | 602 | 602 | 96 | 96 |
| 25 | CHICH10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 26 | CHICH11 | 97 | 97 | 302 | 249 | 111 | 111 | 0 | 0 | 96 | 96 |
| 27 | CHICH12 | 105 | 105 | 0 | 0 | 111 | 111 | 602 | 602 | 112 | 112 |
| 28 | CHIRCH2 | 105 | 105 | 239 | 239 | 111 | 111 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | CHIRCH3 | 97 | 97 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 96 | 96 |
| 30 | CHICH13 | 97 | 97 | 307 | 307 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | CHICH14 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 116 | 116 |
| 32 | CHICH15 | 90 | 90 | 307 | 307 | 127 | 106 | 602 | 602 | 112 | 112 |
| 33 | GTOTEM1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 127 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 34 | GTOTOM1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 127 | 106 | 0 | 0 | 116 | 116 |
| 35 | GTOCUE1 | 90 | 90 | 312 | 312 | 127 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 36 | GTOSPZ1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 127 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 37 | GTOSPZ2 | 90 | 90 | 307 | 307 | 127 | 106 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 38 | GTOVIC1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 39 | GTOTEM2 | 90 | 90 | 312 | 312 | 106 | 106 | 602 | 602 | 100 | 100 |
| 40 | GTOSPZ3 | 90 | 90 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | GTOIRA1 | 90 | 90 | 239 | 239 | 127 | 127 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 42 | GTODOL1 | 90 | 90 | 239 | 239 | 127 | 127 | 0 | 0 | 100 | 100 |

| | | | | | | | | | | | |
|----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|
| 43 | GTOIRA2 | 90 | 90 | 239 | 239 | 127 | 127 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 44 | GTOTEM3 | 90 | 90 | 246 | 246 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 45 | GTODOL1 | 90 | 90 | 239 | 239 | 0 | 0 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 46 | GTOTOM2 | 90 | 90 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | HIDTEO1 | 90 | 90 | 312 | 312 | 127 | 106 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 48 | HIDPRO1 | 90 | 90 | 248 | 248 | 106 | 106 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 49 | HIDPRO2 | 90 | 90 | 312 | 312 | 127 | 106 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 50 | HIDTEO2 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 51 | HIDPRO3 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 52 | HIDTEO3 | 97 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 53 | HIDTEO4 | 0 | 0 | 230 | 230 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54 | HIDTEO5 | 90 | 90 | 0 | 0 | 133 | 127 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 55 | HIDTEO6 | 90 | 90 | 0 | 0 | 127 | 127 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 56 | HIDCRU1 | 90 | 90 | 249 | 249 | 106 | 106 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 57 | HIDTEO7 | 90 | 90 | 0 | 0 | 127 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 58 | HIDTEO8 | 90 | 90 | 249 | 230 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 59 | HIDTEO9 | 0 | 0 | 230 | 230 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | HIDTEO10 | 90 | 90 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 61 | HIDTEO11 | 0 | 0 | 230 | 230 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 62 | HIDCRU2 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 63 | OAXUZA1 | 97 | 90 | 249 | 249 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 64 | OAXUZA2 | 105 | 97 | 249 | 249 | 114 | 114 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 65 | OAXVIL1 | 90 | 90 | 249 | 249 | 0 | 0 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 66 | OAXVIL2 | 90 | 90 | 249 | 249 | 0 | 0 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 67 | OAXUZA3 | 97 | 90 | 249 | 249 | 127 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 68 | OAXSAN1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 69 | JALPAZ1 | 97 | 97 | 0 | 0 | 106 | 98 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 70 | JALSAU1 | 97 | 90 | 249 | 249 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 71 | JALUNI1 | 97 | 97 | 249 | 249 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 72 | JALPAL1 | 105 | 105 | 249 | 249 | 127 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 73 | JALRAN1 | 90 | 90 | 249 | 249 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 75 | JALGRU1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 76 | JALTEQ1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 133 | 103 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 77 | JALGRU2 | 90 | 90 | 0 | 0 | 133 | 133 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 78 | JALMAG1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 79 | JALCOC1 | 90 | 90 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 131 | 131 |
| 80 | JALCUA1 | 0 | 0 | 255 | 230 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 81 | JALPAL2 | 97 | 97 | 0 | 0 | 89 | 89 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 82 | JALCUA2 | 97 | 97 | 249 | 249 | 114 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 83 | JALHAS1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 84 | JALCUA3 | 0 | 0 | 255 | 230 | 114 | 114 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 85 | JALUNI2 | 97 | 97 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 86 | JALCOC2 | 90 | 90 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 87 | JALBAL1 | 97 | 97 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 88 | JALSAN1 | 90 | 90 | 0 | 0 | 89 | 89 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 89 | TLAXTLA1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 106 | 89 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 90 | TLAXTLA2 | 90 | 90 | 0 | 0 | 133 | 114 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 91 | TLAXTLA3 | 90 | 90 | 249 | 249 | 114 | 114 | 0 | 0 | 96 | 96 |
| 93 | NAYIXT1 | 97 | 97 | 246 | 246 | 89 | 89 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 94 | NAYBAL1 | 90 | 90 | 246 | 246 | 89 | 89 | 0 | 0 | 109 | 109 |
| 95 | NAYIXT2 | 97 | 97 | 246 | 246 | 89 | 89 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 96 | ZACJUC1 | 74 | 74 | 246 | 246 | 106 | 106 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 97 | ZACMOY1 | 74 | 74 | 227 | 227 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 98 | ZACJUC2 | 74 | 74 | 216 | 216 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 99 | ZACVIL1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 118 | 102 |
| 100 | ZACAPO1 | 87 | 87 | 209 | 209 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 101 | ZACFEL1 | 74 | 74 | 216 | 216 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 102 | ZACAPO2 | 74 | 74 | 202 | 202 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 103 | ZACOJO1 | 74 | 74 | 230 | 230 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 104 | ZACOJO2 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 105 | ZACMOY2 | 74 | 74 | 216 | 216 | 133 | 133 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 106 | ZACJAL1 | 74 | 74 | 216 | 216 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 107 | ZACJAL2 | 74 | 74 | 216 | 216 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108 | ZACMOY3 | 74 | 74 | 230 | 199 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 109 | ZACMOY4 | 74 | 74 | 230 | 230 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 110 | ZACFEL2 | 74 | 74 | 220 | 220 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 111 | QROCAD1 | 0 | 0 | 241 | 241 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 112 | QROCAD2 | 74 | 74 | 241 | 241 | 138 | 138 | 602 | 602 | 102 | 102 |
| 113 | PUESEB1 | 74 | 74 | 216 | 216 | 138 | 138 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 114 | PUESEB2 | 74 | 74 | 220 | 220 | 117 | 117 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 115 | PUESEB3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 116 | PUESER1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 96 | 96 |
| 117 | PUECTA1 | 74 | 74 | 227 | 227 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 118 | PUESER2 | 74 | 74 | 0 | 0 | 133 | 133 | 0 | 0 | 105 | 105 |
| 119 | PUESEB4 | 0 | 0 | 216 | 216 | 127 | 127 | 602 | 602 | 105 | 105 |
| 120 | PUEESP1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 121 | MICQRO1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 125 | 125 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 122 | MICTZIO1 | 74 | 74 | 241 | 241 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 123 | MICHPUR1 | 74 | 74 | 227 | 227 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 124 | MICORG1 | 74 | 74 | 249 | 227 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 125 | MICPUR2 | 74 | 74 | 227 | 227 | 138 | 138 | 602 | 602 | 102 | 102 |
| 126 | MICTUZ1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 138 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 127 | MICORG2 | 74 | 74 | 246 | 246 | 138 | 138 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 128 | MICHA1 | 74 | 74 | 230 | 230 | 138 | 138 | 602 | 602 | 112 | 112 |
| 129 | MICJAL1 | 74 | 74 | 249 | 249 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 130 | MICVEN1 | 87 | 87 | 202 | 202 | 117 | 117 | 0 | 0 | 107 | 107 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 131 | MICPAS1 | 74 | 74 | 225 | 225 | 117 | 117 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 132 | MICVEN2 | 74 | 74 | 236 | 236 | 117 | 117 | 0 | 0 | 107 | 107 |
| 133 | MICTZIO2 | 74 | 74 | 257 | 257 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 134 | MICPAS2 | 74 | 74 | 227 | 227 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 135 | MICCHA2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 136 | MICHA3 | 74 | 74 | 288 | 288 | 117 | 117 | 565 | 565 | 0 | 0 |
| 137 | MICQRO2 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 112 | 112 |
| 138 | MICQRO3 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 565 | 565 | 0 | 0 |
| 139 | MICMOR1 | 0 | 0 | 227 | 227 | 0 | 0 | 0 | 0 | 109 | 109 |
| 140 | MICQRO4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 141 | MICQRO5 | 101 | 101 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 142 | EDOPLA1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 143 | EDOAME1 | 74 | 74 | 220 | 220 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 144 | EDOZUL1 | 74 | 74 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 145 | EDOPLA2 | 74 | 74 | 227 | 227 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 146 | EDOZUL2 | 74 | 74 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 147 | EDOZUL3 | 74 | 74 | 227 | 227 | 117 | 117 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 148 | EDOZUL4 | 74 | 74 | 220 | 203 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 149 | CAMPTAB1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 111 | 111 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 150 | CAMPTAB2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 111 | 111 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 151 | CAMPTAB3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 138 | 138 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 152 | CAMPTAB4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 114 | 114 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 153 | CAMPTAB5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 111 | 111 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 154 | CAMPTAB6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 111 | 111 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 155 | CAMPTAB7 | 101 | 101 | 0 | 0 | 111 | 111 | 0 | 0 | 102 | 102 |
| 156 | CAMPTAB8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 117 | 117 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 157 | CAMPTAB9 | 101 | 101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

XII GLOSARIO

Alelo: Es cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Antocianinas: Son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos.

Apresorio: Estructura a partir de la cual se origina una hifa afilada que rompe la cutícula de una célula epidérmica del huésped por punción permitiendo la penetración del micelio para establecer la infección de un hongo parásito en plantas.

Basidiomiceto: Son una clase de hongos con aparato vegetativo formado por hifas tabicadas y caracterizadas por sus esporas de origen sexual en el exterior de las células madres, que reciben el nombre de basidios.

Biotrófico: Hongos parásitos que se nutren de las plantas vivas.

Buffer: Solución amortiguadora o solución reguladora, tiene la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes.

Clorosis: Falta de clorofila en las plantas que causa en ellas una pigmentación amarillenta.

Dicarión: Dos núcleos cercanos que probablemente derivaron de distintas células y que se dividen a la vez.

Dimórfico: El término dimórfico aplicado a los hongos, significa que determinadas especies pueden presentar dos aspectos morfológicos diferentes, conocidos como fase micelial y levadura.

Haploide: Aquella célula que posee la mitad de la dotación completa de material genético, es decir de cromosomas.

Heterocigoto: Individuo heterocigoto es cuando los 2 genes del mismo locus de cromosomas homólogos son diferentes, ya que el individuo por ser diploide tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo distinto, que posee dos formas diferentes de un gen en particular.

Heterodímero: Molécula formada por dos componentes diferentes, estrechamente relacionados, como una proteína compuesta por la unión de dos cadenas separadas.

Hiperplasia: Aumento en el número de células en un órgano o tejido.

Hipertrofia: Crecimiento excesivo y anormal de un órgano o de una parte de este debido a un aumento del tamaño de sus células.

Homeodominio: Es un dominio de unión al DNA que consta de unos 60 aminoácidos, presente en las denominadas homeoproteínas.

Homocigoto: Individuo homocigoto es cuando los 2 genes del locus de cromosomas homólogos son idénticos para un mismo carácter, es decir, significa que posee dos copias idénticas de ese gen para un rasgo dado.

Locus: Es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador (marcador genético).

Marcador molecular: Es un segmento de DNA con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida.

Polimorfismo: Hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

Recombinación genética: Es el proceso por el cual una hebra de material genético (usualmente DNA, pero también puede ser RNA) se corta y luego se une a una molécula de material genético diferente.

RNAsa: Enzima ribonucleasa que actúa degradando al RNA.

Saprofítica: Que se alimenta de materia orgánica muerta, como algunos hongos y bacterias.

Taq DNA polimersa: Es un tipo de DNA polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus*, y es frecuentemente utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de DNA.