

Primer Reporte de la Secuencia de ITS de *Ustilago quitensis* en *Cortaderia jubata* en Ecuador

Charles Wesley BARNES

Centro de Investigación de la Biodiversidad y el Cambio Climático
Universidad Tecnológica Indoamérica
Av. Machala y Sabanilla; Quito, Ecuador
barn0107@gmail.com

Maria Eugenia ORDÓÑEZ
MALDONADO

Escuela de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Av. 12 de octubre 1076 y Roca;
Quito, Ecuador
meordonez@puce.edu.ec

Daniel TESTONI

Departamento de Biología,
Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional del Sur
San Juan 670. Primer Piso;
Bahía Blanca, Argentina
testoni.d@gmail.com

Carlos B. VILLAMIL

Departamento de Biología,
Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional del Sur
San Juan 670. Primer Piso;
Bahía Blanca, Argentina
cbvillam@criba.edu.ar



RESUMEN

Cortaderia jubata es un pasto común a lo largo de las carreteras en las regiones andinas de Ecuador. Ocasionalmente, algunas de estas plantas se enferman. Uno de los hongos que causan estas enfermedades, *Ustilago quitensis*, es un carbón que infecta a las inflorescencias de la planta. *Ustilago quitensis* (syn. *U. cortaderiae*) infecta a *C. jubata* y otras especies de *Cortaderia*; se piensa que está distribuido en toda América Central y del Sur, pero solo ha sido reportado en Argentina, Bolivia, Chile y Ecuador. *Ustilago quitensis* ha sido reportado específicamente infectando *C. jubata* en Bolivia y Ecuador. En este reporte se documenta por primera vez la secuencia de ADN de la región de espaciadores internos que no se transcriben (ITS) de *U. quitensis* en *C. jubata* en Ecuador. Se describe, además, la morfología de las teliosporas. La secuencia de ADN puede utilizarse para entender la relación filogenética del carbón que infecta varias especies de *Cortaderia* en América Central y del Sur.

PALABRAS CLAVE

Carbón, *Cortaderia jubata*, *Ustilago cortaderiae*, *Ustilago quitensis*, secuencia ITS, teliosporas.

ABSTRACT

Cortaderia jubata is a common grass along the roadsides of the Andean regions of Ecuador. Occasionally, some of these plants are infected by disease. One of these diseases, *Ustilago quitensis*, is a smut fungus that infects the seed heads or panicle of the plant. *Ustilago quitensis* (syn. *U. cortaderiae*) infecting *C. jubata* and other *Cortaderia* species is thought to occur throughout Central and South America, but has only been reported in Argentina, Bolivia, Chile, and Ecuador. *Ustilago quitensis* has only been reported specifically infecting *C. jubata* in Bolivia and Ecuador. In this report we document for the first time the DNA sequence of the internal transcribed spacer region (ITS) of *U. quitensis* on *C. jubata* in Ecuador. Additionally, we describe the morphology of the teliospores. The DNA sequence could be used to understand the phylogenetic relationship of the smut fungus infecting various *Cortaderia* species in Central and South America.

KEYWORDS

Smut fungus, *Cortaderia jubata*, *Ustilago cortadereae*, *Ustilago quitensis*, ITS sequence, teliospores.



1. Introducción

Los carbones son un grupo importante de hongos fitopatógenos que pueden infectar principalmente gramíneas de las familias Poaceae y Cyperaceae. Estos causan enfermedades de importancia económica en maíz, cebada, trigo, avena, caña de azúcar y pastos forrajeros. Las pérdidas para los agricultores pueden incrementarse significativamente debido a restricciones en importaciones aplicadas a cultivos o plantas ornamentales que tienen un bajo grado de infección que llevan al rechazo de cargamentos enteros, o por la pérdida de socios comerciales.

Los síntomas de los carbones, son frecuentemente masas de esporas polvorientas oscuras visibles a simple vista (Figura 1). Generalmente las esporas se dispersan con el viento o por insectos polinizadores, pero pueden ser transportadas al entrar en contacto con las personas o animales. Bajo condiciones húmedas, las esporas germinan produciendo un promicelio y basidiosporas (Figura 2). Las basidiosporas son haploides y pueden gemar en forma semejante a levaduras y formar esporidios [1]. Los esporidios provenientes de tipos de apareamiento diferentes pueden unirse por conjugación y formar hifas dicarióticas capaces de infectar a un hospedero susceptible. Se conocen alrededor de 1300 especies de carbones a nivel mundial, pero ciertamente se estima que existen muchas especies aún por descubrirse [2].

Estos hongos, al igual que las royas, son frecuentemente específicos a un hospedero. Por ejemplo, el carbón parcial (*Tilletia indica*) puede afectar solo trigo (*Triticum aestivum*), triticale (*Triticum aestivum* × *Secale cereale*), y el trigo duro (*Triticum durum*) [3]. Debido a que pueden tener una estricta especificidad de hospedero, los carbones y las royas son cotizados como agentes de control biológico [4].

Cortaderia jubata (Lemoine) Stapf (sigse o pasto de pampas) es un pasto grande, apomítico, [5] nativo de la Cordillera de los Andes, de la zona norte de Argentina, de Bolivia, Perú y

Ecuador [6, 7]. Sin embargo, *C. jubata* es conocida como una agresiva planta invasora de la costa de California, Hawaii, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica [8].



Figura 1. *Cortaderia jubata* infectada por *Ustilago quitensis*. A la izquierda, planta con inflorescencias infectadas y no infectadas. Las dos fotos a la derecha muestran cómo el hongo reemplaza a la semilla por millones de esporas secas, llamadas teliosporas.

C. jubata puede ser infectada por *Ustilago quitensis* Lagerh. (Figura 1) [2]. Se debe resaltar que dos nombres de especie pueden encontrarse en la literatura para la infección de *Ustilago* en *C. jubata*: *U. quitensis* y *U. cortaderiae*. El nombre oficial es *U. quitensis*, y *U. cortaderiae* es un sinónimo [9]. *Ustilago quitensis* ha sido documentado en Argentina [10], Bolivia [2], Chile [11], y Ecuador [12] en otras especies de *Cortaderia* [13, 14]. *Ustilago quitensis* solo ha sido reportado específicamente en *C. jubata* en Bolivia [2] y Ecuador [15], sin embargo, no hay secuencia del ADN disponible públicamente en GenBank que permita determinar la relación filogenética entre las muestras de *U. quitensis* de los diferentes países y hospederos.

La región de espaciadores internos del ADN ribosomal que no se transcriben (*Internal Transcribed Spacer*, ITS), ha sido utilizada como blanco para la identificación y análisis de la diversidad de hongos, y recientemente ha sido seleccionada como el marcador estándar para el código de barras de ADN en hongos [16]. El objetivo del presente estudio fue documentar la presencia de *U. quitensis* en el Ecuador, que incluyera mediciones de teliosporas, fotografías de la germinación de teliosporas y secuencias

de la región ITS del ADN ribosomal. Se compararon secuencias de ITS de otros carbonos disponibles en GenBank con la secuencia de *U. quitensis* encontrado en el Ecuador para ilustrar su relación filogenética.

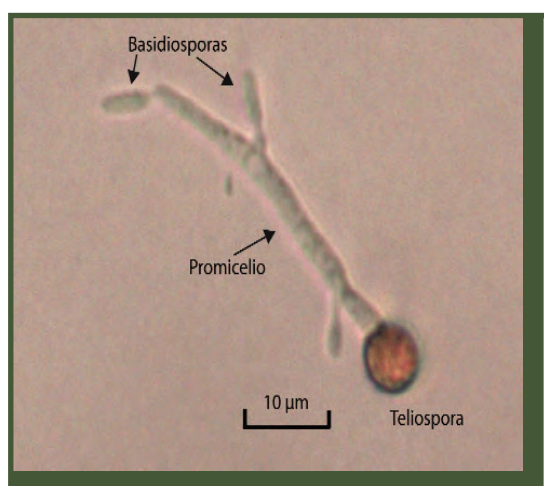


Figura 2. Germinación de una teliospora mostrando un basidio y tres basidiosporas.

2. Métodos

2.1. Colecta, registro y preparación de las muestras

U. quitensis fue colectado a partir de *C. jubata* en la provincia de Chimborazo, al sur de Riobamba y norte de Pungal (01° 48' 10,0" S; 78° 35' 26,5" O), en abril de 2012 (Figura 3).

Las inflorescencias infectadas de *C. jubata* fueron colocadas en papel periódico, aplanadas en una prensa para plantas y llevadas al laboratorio de la Universidad Tecnológica Indoamérica, en Quito. Las muestras se dejaron secar por una semana. Las teliosporas obtenidas a partir de las inflorescencias fueron suspendidas en agua destilada estéril, se fotografiaron, midieron y germinaron, y posteriormente se emplearon en la extracción de ADN desde la misma suspensión.

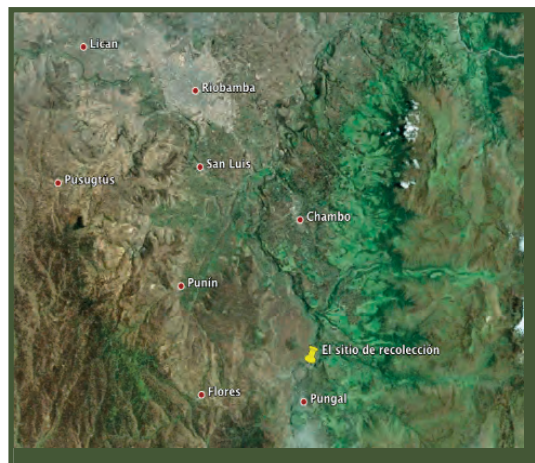


Figura 3. El alfiler amarillo muestra el sitio de colección (01° 48' 10,0" S; 78° 35' 26,5" O) de *Ustilago quitensis*.

2.2. Medición de las esporas

Las teliosporas fueron fotografiadas a una magnificación de 400X con un microscopio Olympus CX31 (Olympus Latin America Inc, FL, USA) (Figura 2). Se midió el largo y ancho de 20 esporas usando la cámara y software de Lumenera Infinity1-2 (Lumenera Corporation, ON, Canadá).

2.4. Extracción del ADN

La suspensión estéril de teliosporas se colocó en agar de papa-dextrosa, complementado con sulfato de estreptomina (0,01 g/L) y benomil (0,06 g/L) para controlar la contaminación bacteriana y de ascomicetes, respectivamente. Luego de dos días de crecimiento a temperatura ambiente, los esporidios fueron recogidos de la caja de agar para la extracción del ADN. El ADN fue extraído de esporidios al colocar 1–5 mg aproximadamente de esporidios frescos en tampón de lisis con proteinasa K a 55 °C por 3 horas. Las proteínas se precipitaron con una solución 4M de Tiocionato de Guanidina, seguido por la precipitación de ADN con isopropanol. El ADN fue limpiado con acetato de sodio 3 M y precipitado nuevamente con etanol al 70%. El ADN concentrado fue almacenado

en TrisEDTA pH 8.0, mientras que las diluciones de ADN usadas para la amplificación se ajustaron a 25 ng/ μ l en agua destilada estéril.

2.5. Amplificación del ADN

El ADN fue amplificado utilizando los cebadores estándar ITS1 e ITS4 [17] para amplificar las dos regiones de espaciadores internos que no se transcriben (ITS). Los productos de amplificación fueron secuenciados por *MacroGen Sequencing Team* (MacroGen Inc., Seoul, Korea).

2.6. Análisis filogenético

Las muestras cuyas secuencias fueron incluidas en el análisis filogenético se muestran en la Figura 4. Las secuencias se alinearon a los 10 mejores emparejamientos de *Ustilago* obtenidas por la búsqueda Blastn en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Se realizó un análisis de máxima verosimilitud, con 1000 réplicas de *bootstrap*. Para los grupos externos se incluyeron secuencias de *Tilletia* (otro género de carbores) y de *Puccinia graminis* (que difieren a nivel de subfilum). Las alineaciones y análisis filogenético se hicieron usando el programa Geneious Pro 5.4.6 [18].

3. Resultados y Discusión

3.1. Dimensiones de las esporas

Las dimensiones de las esporas de *U. quitensis* fueron análogas con aquellas de otros carbores (Tabla 1) [19]. Encontramos un diámetro mínimo de teliosporas de 5,5 μ m y máximo de 9,2 μ m, con un promedio de 7,3 μ m \times 7,6 μ m (n = 20), las cuales están dentro del promedio reportado anteriormente para *U. quitensis*, de 6 μ m y 10 μ m (12,20). Además, la germinación de esporas y formación de basidiosporas y esporidios fueron coherentes para el género *Ustilago* [1]. No obstante, es posible que exista variación en la morfología de las esporas dentro de las poblaciones de *U. quitensis* en Ecuador o en Centro y Sudamérica.

Las dimensiones de las esporas del presente trabajo brindarán una primera y fácil verificación de la variabilidad dentro de la especie, o de otros carbores posibles que infecten a *C. jubata*.

3.2. Análisis filogenético

La secuencia de la región ITS obtenida en este trabajo (número de accesoión de GenBank JX141396) mostró que *U. quitensis* es único. Los resultados de Blastn mostraron que la similitud más cercana del 87% de identidad máxima (691 bases de 793) correspondió

Tabla 1. Promedio del tamaño de las esporas de especies de *Ustilago*. Todas las medidas son tomadas de Crozter y Levetin [19], excepto para *U. quitensis*, obtenida en este estudio.

| Especies de <i>Ustilago</i> | Promedio del tamaño de la espora (μ m) |
|-----------------------------|---|
| <i>U. avenae</i> | 6,3 \times 5,4 |
| <i>U. bouelouise</i> | 9,5 \times 8,3 |
| <i>U. bromivora</i> | 10,6 \times 9,5 |
| <i>U. bulbosa</i> | 6,7 \times 6,5 |
| <i>U. cynodontis</i> | 7,2 \times 6,5 |
| <i>U. hordei</i> | 8,9 \times 7,9 |
| <i>U. killei</i> | 7,8 \times 6,7 |
| <i>U. mayalis</i> | 8,4 \times 7,7 |
| <i>U. minima</i> | 4,1 \times 3,7 |
| <i>U. nuda</i> | 6,5 \times 5,8 |
| <i>U. rabenhorstiana</i> | 11,6 \times 9,6 |
| <i>U. strigiformis</i> | 10,5 \times 9,8 |
| <i>U. syntherismae</i> | 11,8 \times 9,1 |
| <i>U. tritici</i> | 6,3 \times 5,1 |
| <i>U. quitensis</i> | 7,6 \times 7,3 |

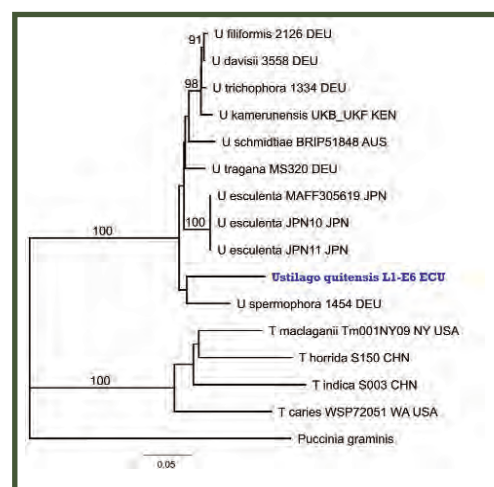


Figura 4. Árbol filogenético de carbones selectos. La filogenia fue generada utilizando el método de máxima verosimilitud en PHYML en Geneious Pro, con secuencias que abarcan la región de ITS1, 5.8S e ITS2. Los valores de bootstrap (>80% se muestran) son de 1000 réplicas. *Ustilago quitensis* colectado en este estudio se muestra en azul. Nomenclatura: U para *Ustilago*, T para *Tilletia*, seguido del nombre de la especie, número de aislado, y código de tres letras para el país.

A *Oryza longistaminata* (DQ143127.2 y DQ143128.2), una especie gramínea. Esta similitud con *O. longistaminata* muy probablemente se debe a un error por contaminación en la secuencia en GenBank. Los emparejamientos más cercanos, todos de especies de *Ustilago*, dieron un valor de identidad máxima entre el 85–86% (Figura 4). Como se mencionó anteriormente, el presente estudio contribuirá a identificar la variabilidad dentro de la población de *U. quitensis* en estudios futuros que utilicen datos de secuencia del ITS y, posiblemente, permitan ubicar el lugar de origen de la especie o su habilidad para infectar otras especies de plantas, incluidas otras especies o variedades de *Cortaderia*, y su relación filogenética.

4. Conclusiones

El carbón que infecta a *C. jubata*, encontrado en la provincia de Chimborazo, corresponde al primer registro de la secuencia de ITS de *U. quitensis* en *C. jubata* en el Ecuador. La morfología de las teliosporas corresponde con aquellas reportadas para el género, sin embargo, la secuencia de la región ITS del ADN ribosomal distingue a este hongo como único dentro de los carbones reportados en GenBank.

Los estudios futuros deben enfocarse en caracterizar más colecciones del hongo en la zona de distribución de *C. jubata* para determinar la variabilidad existente en la población de *U. quitensis* en el Ecuador, y el resto de América del Sur y Central. Los datos de diversidad poblacional y especificidad de hospedero, son muy útiles para aplicaciones de control biológico utilizando el hongo en zonas donde *C. jubata* es invasora.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a Landcare Research, Nueva Zelanda, por el aporte financiero para realizar este estudio a través del proyecto “Pampas Survey in Southern Ecuador”, y a Diana Flores en la Universidad Tecnológica Indoamérica, por su trabajo en el laboratorio. También agradecemos a la Universidad Tecnológica Indoamérica por el financiamiento brindado a través del proyecto “Descubriendo la biodiversidad de hongos en el Ecuador: aplicaciones y efectos sobre plantas silvestres y cultivables”.

6. Referencias

- [1] Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., and Stalpers J. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford, Reino Unido: Cab International. 771 p.
- [2] Piepenbring, M. 2002. Diversity, taxonomy, and ecology of plant parasitic smut fungi in Bolivia. *Ecología en Bolivia* 37(1):49–58.
- [3] Stull, M. A. 2004. *Karnal Bunt Manual: Karnal Bunt, Tilletia indica Mitra (Synonym Neovossia indica (Mitra) Mundkur)*. Ed. R. Guerra. EEUU: United States Department of Agriculture. 160 p.
- [4] Hokkanen H., and Lynch, J. 2003. *Biological Control: Benefits and Risks*. New York, EEUU: Cambridge University Press. 328 p.
- [5] Costas-Lippmann, M. 1979. Embryogeny of *Cortaderia selloana* and *C. jubata* (Gramineae). *Botanical Gazette* 140: 393–397.
- [6] Conner, H. E., and Edgar, E. 1974. Names and types in *Cortaderia* Stapf. (Gramineae). *Taxon* 23:595–605.
- [7] Astegiano, M. E., Anton, A. M. and Conner, H. E. 1995. Sinopsis del género *Cortaderia* (Poaceae) en Argentina. *Darwiniana* 33:43–51.
- [8] Okada M., Lyle, M., and Jasieniuk, M. 2009. Inferring the introduction history of the invasive apomictic grass *Cortaderia jubata* using microsatellite markers. *Diversity and Distributions* 15:148–157.

- [9] Farr, D.F., and Rossman, A.Y. 2012. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Obtenido 11 julio 2012. Disponible en <http://nt.ars-grin.gov/fungal-databases/>
- [10] Hirschhorn, E. 1986. *Las ustilaginales de la flora Argentina*. Provincia de Buenos Aires, Argentina: Comisión de Investigaciones Científicas. 530 p.
- [11] Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2012. Obtenido el 7 de junio 2012. Disponible en <http://data.gbif.org/species/3369682/>
- [12] Patouillard, N., Lagerheim, G. 1895. Champignons de l'Équateur (pugillus IV). *Bulletin de l'Herbier Boissier* 3(2):53–74.
- [13] Vanky, K. 2004. Biodiversity and conservation of smut fungi (Ustilaginomycetes p.p. and Microbotryales) reflected in Vanky, Ustilaginales exsiccata no. 1–1250. *Mycologia Balcanica* 1:175–187.
- [14] Vanky, K., Shivas, R. G., McTaggart, A. R., Vanky, C., and Arce, W.A. 2009. Additions to the smut fungi (Ustilaginomycetes) of Bolivia. *Mycologia Balcanica* 6:99–105.
- [15] Piepenbring, M. 2003. *Smut fungi: (Ustilaginomycetes PP and Microbotryales, Basidiomycota)*. New York, EEUU: Organization for Flora Neotropica by New York Botanical Garden. 291 p.
- [16] Schocha, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium, 2. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16).
- [17] White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Ed. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. New York, EEUU: Academic Press, Inc. pp. 315–322.
- [18] Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., and Wilson, A. 2011. *Geneious v5.4*. Disponible en <http://www.geneious.com/>
- [19] Crotzer, V., and Levetin, E. 1996. The aerobiological significance of smut spores in Tulsa, Oklahoma. *Aerobiologia* 12:177–184.
- [20] Piepenbring, M., and Gagedorn G. Global Information System for the Biodiversity of Plant Pathogenic Fungi. Disponible en <http://www.diversitycampus.net/GLOPP/Descriptions/smut/150.html>