

## Efecto del pH y de la Fuente de Carbono Sobre el Crecimiento Vegetativo de *Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn. en medio de cultivo sólido y líquido

### *Effect of pH and Carbon Source on the Vegetative Growth of Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn. in a solid and liquid culture medium

**Patricio Adrián Zapata-Morín**, Univ. Aut. de Nuevo León, Fac. de Ciencias Biológicas, Lab. de Micología y Fitopatología (UANL-FCB-LMF), Unidad "C" 2° Piso, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México CP 66451; **Guillermo Fuentes-Dávila**, INIFAP, Campo Experimental Valle del Yaqui, Norman E. Borlaug, km 12, Apdo. Postal 155, Cd. Obregón, Sonora, México CP 85000; **Juan Manuel Adame-Rodríguez** y **Elva Teresa Aréchiga-Carvajal**, UANL-FCB-LMYF. Correspondencia: elva.arechigacr@uanl.edu.mx

(Recibido: Abril 12, 2010    Aceptado: Julio 21, 2010)

Zapata-Morín, P.A., Fuentes-Dávila, G., Adame-Rodríguez, J.M. y Aréchiga-Carvajal, E.T. 2010. Efecto del pH y de la Fuente de Carbono Sobre el Crecimiento Vegetativo de *Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn. en medio de cultivo sólido y líquido. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:159-161.

Zapata-Morín, P.A., Fuentes-Dávila, G., Adame-Rodríguez, J.M. and Aréchiga-Carvajal, E.T. 2010. Effect of pH and Carbon Source on the Vegetative Growth of *Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn. in a solid and liquid culture medium. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:159-161.

**Resumen.** El desarrollo de *Ustilago cynodontis* en cajas Petri con medio sólido en MM glucosa con pH 3-7 fue predominantemente micelial; crecimiento similar se observó en MM glicerol con pH de 3-5. El crecimiento micelial y de levadura se observó en cajas Petri en MM glucosa con pH 8 a las 96 h de incubación, y en MM glicerol con pH 5 a las 96 h y con pH 8 a las 24 h. La forma de levadura se observó en este último medio con pH 6-8 a las 48 y 96 h. En tubos cónicos en medio líquido con MM glucosa, el crecimiento fue micelial en pH 3 y 4, y en pH 5, 6, 7 y 8 a las 24 y 48 h. Crecimiento similar se observó en MM glicerol en los mismos pH e intervalos de tiempo. La forma de micelio y levadura se presentó en pH 5 y 6 a las 96 h en ambos medios y en pH 7 y 8 en MM glucosa a las 96 h, mientras, que la forma de levadura se presentó en pH 7 y 8 en MM glicerol a las 96 h.

**Abstract.** Mycelial growth of *Ustilago cynodontis* was observed in Petri plates with solid medium MM glucose at pH 3-7 and in MM glycerol pH 3-5. Mycelial-yeast growth type was observed in Petri plates with MM glucose pH 8 at 96 h incubation, and in MM glycerol pH 5 at 96 h and with pH 8 at 24 h. Yeast growth type was observed in the last medium with pH 6-8 at 48 and 96 h. Mycelial growth was observed in tubes with liquid medium MM glucose at pH 3 and 4, and pH 5, 6, 7, and 8 at 24 and 48 h. Similar growth was observed in MM glycerol at the same pH 6 and time intervals. The mycelial-yeast growth type occurred at pH 5 and 6 at 96 h in both media and at pH 7 and 8 in MM glucose at 96 h, while the yeast type of growth occurred at pH 7 and 8 in MM glycerol at 96 h.

Additional keywords: *Cynodon dactylon*, Ustilaginales, smut.

Palabras clave adicionales: *Cynodon dactylon*, Ustilaginales, carbón.

**INTRODUCCIÓN.** La importancia de la introducción de modelos en Ustilaginales reside en el conocimiento de los mecanismos de infección y para comparación de especies. Una propuesta de un modelo es *Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn., ya que posee características representativas de los Ustilaginales y es un hongo dimórfico con capacidad de desarrollo como micelio y como levadura. Una característica

**INTRODUCTION.** The importance of Ustilaginal models introduction lies on the proper understanding of the infection mechanisms and for species comparison. A proposal for a model is *Ustilago cynodontis* (Pass.) Henn., it has representative Ustilaginal characteristics, as well as a dimorphic fungus with mycelium and yeast development capacity. An important feature of this organism is the fact that it prevails in its mycelium form in most laboratory culture conditions, as it has pH conditions in a 3-7 range with glucose presence at 1%). the present study is aimed to

importante de este organismo es que predomina en su forma de micelio en la mayoría de las condiciones de cultivo de laboratorio al tener condiciones de pH en un rango de 3 a 7 con presencia de glucosa al 1%. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del pH y de la fuente de carbono sobre el crecimiento vegetativo de *U. cynodontis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de teliosporas y preparación de inóculo.** La muestra de *C. dactylon* infectada por *U. cynodontis* se obtuvo de la colección de Durán (1987) la cual se mantuvo a 20-22 °C  $\pm$  2 °C. Las teliosporas se aislaron de ovarios infectados sobre una solución de agua con Tween 20 (1 gota L<sup>-1</sup> de agua) y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0.5% i.a.) mientras se centrifugaba a 3,000 rpm min<sup>-1</sup>; el mismo procedimiento de centrifugación se hizo con agua destilada esterilizada. Las teliosporas se transfirieron a cajas Petri con agar-agua y se incubaron a 20-22 °C  $\pm$  2 °C durante 48 h. A partir de las colonias del hongo, se tomó una muestra y se sembró en medio agar-levadura-peptona-dextrosa (YPD, 50 g/L) + 1  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> de ampicilina con una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup>.

**Inducción a la diferenciación.** En tubos cónicos Falcon de 50 mL se agregaron de 5 a 10 mL de YPD, y luego se sembró material propagativo (levadura) del hongo y se incubó por 24 h. Se inoculó *U. cynodontis* en 10 mL de medio completo (MC) (Holliday, 1961). El cultivo se creció en un tubo cónico a 28 °C y en constante agitación durante 48 h, luego se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y luego en un matraz de 1 litro se agregaron 250 mL de medio completo pH 7 y se incubó de 18-20 h a 28 °C. Se centrifugó, se lavó con agua destilada estéril y se resuspendió en 30 mL de agua bidestilada estéril; se aforó a 250 mL en agua bidestilada estéril a 28 °C y se mantuvo en agitación por 3 h. Se cosecharon nuevamente las células vegetativas por centrifugación y se lavaron dos veces con agua bidestilada estéril. Se resuspendió el precipitado en 25 mL de agua bidestilada y se le dio un choque frío por 15-30 min antes de su uso, posterior a esto se mantuvo a 4 °C por 24 h. Se determinó la morfología del hongo durante su crecimiento a las 24, 48 y 96 h, tanto en cajas Petri como en tubos cónicos con medio mínimo (MM) (Kempner y Miller, 1972) con glucosa y glicerol (1%) como fuente de carbono.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.** El desarrollo de *U. cynodontis* en cajas Petri con MM + glucosa (Cuadro 1, S1) fue predominantemente de micelio (Fig. 1A) en pH 3 a 7, durante los diferentes intervalos de tiempo, y con 8, a las 24 y 48 h; desarrollo similar se observó en cajas Petri con glicerol y MM (S2) con pH de 3 y 4, con 5 a las 24 y 48 h, y con 6 y 7 a las 24 h. El desarrollo micelial y levaduriforme se observó en cajas Petri en MM + glucosa (S1) con pH 8 a las 96 h, y en MM + glicerol (S2) con pH 5 a las 96 h y con pH 8 a las 24 h (Fig. 1B). El desarrollo levaduriforme se observó en este último medio con pH 6-8 a las 48 y 96 h (Fig. 1C). En los tubos cónicos con MM + glucosa (Cuadro 1, L1), el desarrollo fue micelial en pH 3 y 4, y en pH 5, 6, 7 y 8 a las 24 y 48 h. Desarrollo similar se observó en MM + glicerol (L2) en los mismos pH e intervalos de tiempo. La forma micelial y

determine the effect of pH and carbon source on the vegetative growth of *U. cynodontis*.

## MATERIALS AND METHODS

**Teliospore isolation and inoculum preparation.** The sample of *C. dactylon* infected by *U. cynodontis* was obtained from the Duran collection (1987) which was kept at 20-22 °C  $\pm$  2 °C. The teliospores were isolated from infected ovaries on a water solution with Tween 20 (1 drop L<sup>-1</sup> of water), and it was disinfected with sodium hypochlorite (0.5% i.e.) while it was centrifuged at 3,000 rpm min<sup>-1</sup>; the same procedure was performed with sterilized distilled water. The teliospores were transferred to Petri dishes with agar-water and incubated at 20-22 °C  $\pm$  2 °C for 48 h. A sample was taken from the fungus colonies planted it in an agar-yeast-peptone-dextrose medium (YPD, 50 g/L) + 1  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> of ampicillin at a 50 mg mL<sup>-1</sup> concentration.

**Differentiation induction.** A total of 5 to 10 mL of YPD was added in Falcon conical tubes of 50 mL; then fungus nursery stock (yeast) was planted and incubated for 24 h. The *U. cynodontis* became evaluated in 10 mL of complete medium (CM), and prepared according to Holliday (1961) in order to evaluate the vegetative growth. The crop was grown in a conical tube at 28°C and it was constantly stirred for 48 h; after that, it was centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and then 250 mL of pH 7 complete medium were added into a 1 liter flask and incubated for 18-20 h at 28 °C. It was centrifuged, washed with sterile distilled water and re-suspended in 30 mL of sterile bi-distilled water; it was diluted to 250 mL in sterile bi-distilled water at 28 °C and kept under stirring for 3 h. The vegetative cells were harvested again by centrifugation and washed twice with sterile distilled water. The pellet was re-suspended in 25 mL of distilled water and given a cold shock for 15-30 min. before use. Afterwards, it was kept at 4 °C for 24h. The fungus morphology was determined in its growth at 24, 48 and 96h, in Petri dishes as well as in conical tubes with minimal medium (MM) (Kempner and Miller, 1972) with glucose and glycerol (1%) as carbon source.

## RESULTS AND DISCUSSION

The development of *U. cynodontis* in Petri dishes with MM + glucose (Table 1, S1) was predominantly mycelium (Fig. 1A) in pH 3 at 7, during the different sets of time, and with 8, at 24 and 48 h; a similar development was observed in Petri dishes with glycerol and MM (S2) with a pH of 3 and 4, with 5 at 24 and 48 h, and with 6 and 7 at 24 h. The mycelia and yeast development was observed in Petri dishes in MM + glucose (S1) with pH 8 at 96 h, and in MM + glycerol (S2) with pH 5 at 96 h and with pH 8 at 24 h (Fig. 1B). The yeast development was observed in this last medium with pH 6-8 at 48 and 96 h (Fig. 1C). A mycelia development was revealed in the conical tubes with MM + glucose (Table 1, L1) in pH 3 and 4, and in pH 5, 6, 7, and 8 at 24 and 48 h. A similar growth was observed in MM + glycerol (L2) in the same pH and time intervals. The mycelia and the yeast form was revealed in pH 5 and 6 at 96 h in both mediums and in pH 7 and 8 in MM + glucose at 96 h, whereas the yeast form was revealed in pH 7 and 8 in MM +

Cuadro 1. Tipo de crecimiento vegetativo de *Ustilago cynodontis* en medio sólido y líquido a base de glucosa o glicerol 1%, a seis valores de pH.

Table 1. Type of vegetative growth of *Ustilago cynodontis* in both solid and liquid medium with a base of glucose or glycerol 1% at six pH values.

Crecimiento como micelio (M), levadura (L), micelio-levadura (M-L)							
Medio mínimo adicionado con:	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	Incubación (h)
Glucosa 1%, sólido (S1).	M	M	M	M	M	M	24
	M	M	M	M	M	M	48
	M	M	M	M	M	M-L	96
Glicerol 1%, sólido (S2).	M	M	M	M	M	M-L	24
	M	M	M	L	L	L	48
	M	M	M-L	L	L	L	96
Glicerol 1%, sólido (S2)	M	M	M	M	M	M	24
	M	M	M	M	M	M	48
	M	M	M-L	M-L	M-L	M-L	96
Glicerol 1%, sólido (S2)	M	M	M	M	M	M	24
	M	M	M	M	M	M	48
	M	M	M_L	M_L	L	L	96

levaduriforme se presentó en pH 5 y 6 a las 96 h en ambos medios y en pH 7 y 8 en MM + glucosa a las 96 h, mientras, que la forma de levadura se presentó en pH 7 y 8 en MM + glicerol a las 96 h. *U. cynodontis* predominó en forma micelial tanto en medio líquido como sólido, mientras que el tipo levaduriforme sólo se observó cuando se utilizó una forma de carbono no fermentativa (Durieu-Trautmann y Tavlitzki, 1975). En el presente estudio se utilizó glicerol y glucosa como fuentes de carbono, y se observaron cambios notables morfológicos de *U. cynodontis* a través de las diferentes concentraciones de potenciales de iones hidrógenos que se adicionaron al medio; sin embargo, la forma de levadura sólo se observó en medios con pH básicos en los cuales la fuente de carbono fue glicerol. El crecimiento del hongo en estos medios fue similar a lo reportado por Durieu-Trautmann y Tavlitzki (1975). El crecimiento de *U. cynodontis* en los medios sólido y líquido con glicerol (Cuadro 1, S2, L2) en pH 6, 7 y 8, pudo ser una respuesta al factor adicional de estrés que se generó en la vía de desarrollo del hongo, ya que en el medio sólido el crecimiento a las 48 h fue en forma de levadura en contraste con la estructura micelial del medio líquido.

**LITERATURA CITADA.**

Durieu-Trautmann, O., and Tavlitzki, J. 1975. Reversible and permanent effects of the carbon sources and various antibiotics on the morphology and metabolic properties of *Ustilago cynodontis* cells. The Journal of Cell Biology 66:102-113.

Holliday, R. 1961. The genetics of *Ustilago maydis*. Genetic Research Cambridge 2:204-230.

Kempner E., and Miller, J.H. 1972. Inorganic requirements for a minimal culture medium. The molecular biology of *Euglena gracilis*. Journal of Protozoology 19:343-346.

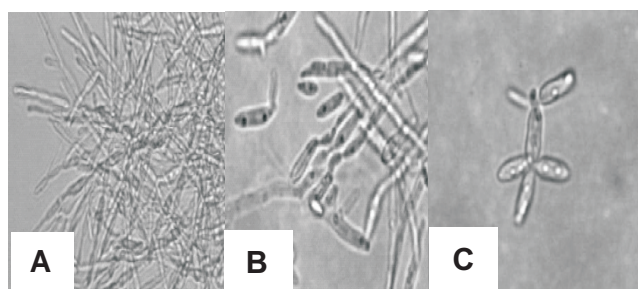


Figura 1. Crecimiento vegetativo de *Ustilago cynodontis* en medio de cultivo A) micelial, B) micelio-levadura, C) levadura (100X).

Figure 1. Vegetative growth of *Ustilago cynodontis* in culture medium A) mycelia, B) mycelia-yeast, C) yeast (100X).

glycerol at 96 h. *U. cynodontis* predominated in micelial form in both liquid and solid medium, while the type yeast was only observed when a non-fermentative carbon source was used (Durieu-Trautmann and Tavlitzki, 1975). The study hereby used glycerol and glucose as carbon sources, and significant changes were observed on *U. cynodontis* morphology through the potential of different hydrogen ions concentrations that were added to the medium; nevertheless, the yeast form was observed only in mediums with basic pH in which the carbon source was glycerol. The growth of the fungus in this medium was similar to what has been previously reported by Durieu-Trautmann y Tavlitzki (1975). The growth of *U. cynodontis* in a solid and liquid medium with glycerol (Table 1, S2, L2) at pH 6, 7 and 8, could have been the response to an additional stress factor that was generated in the path of fungus development because in the solid medium the growth at 48 h was in the form of yeast, in contrast to the mycelia structure of the liquid medium.