

## ESTUDIOS SOBRE HONGOS PARASITOS DE GRAMINEAS DE LA REPUBLICA MEXICANA. VI. EFECTO DE AMINOACIDOS EN EL CRECIMIENTO DE *FUSARIUM MONILIFORME* SHELDT EMEND SNY. Y HANSEN

MARTHA ZENTENO ZEVADA\*

### RESUMEN

Se estudió la influencia de distintos aminoácidos como fuentes de nitrógeno sobre un aislamiento monospórico de *Fusarium moniliforme*. Los aminoácidos se agregaron al medio básico en dos concentraciones diferentes; los medios fueron esterilizados en autoclave. El experimento se llevó a cabo en medios líquidos y en cultivo estacionario. El crecimiento del hongo se apreció en peso seco de micelio en miligramos.

El aminoácido que favoreció más el desarrollo del hongo fue L-cistina, después el triptofano y en tercer lugar la glicina y el ácido-L glutámico. En los otros aminoácidos probados también creció el hongo; pero con rendimientos muy inferiores. Hubo diferencias en el crecimiento en las dos concentraciones a las que se empleó el aminoácido, así como en las formas L y DL de asparagina.

Se utilizaron distintos valores de pH y en todos creció el hongo.

### SUMMARY

There were tested different amino acids as nitrogen sources in a monosporic isolation of *Fusarium moniliforme*. Amino acids were added to the basal medium in two different concentrations.

The media were sterilized by autoclave. The test was conducted in liquid media and stationary culture. Micelial growth was measured as mycelial dry weight.

The amino acid which gave the highest development of the fungus was L-cystine, the next one was tryptophane and in the third place glycine and L-glutamic acid. There was also micelial growth in the other tested amino acids, but with low yields. There were differences in micelial growth between the two different concentrations of the amino acid, and also between L and DL asparagine.

There were tested different pH values, and there were micelial growth in all of them.

### INTRODUCCION

Existe una literatura más o menos numerosa en relación con el uso de aminoácidos en la nutrición de los hongos. Pelletier y Keit (1954), encontraron diferencias en el aprovechamiento de distintos aminoácidos

para la producción de micelio de *Venturia inaequalis*; Converse (1953), estudió la influencia de diferentes aminoácidos y otros compuestos nitrogenados en el crecimiento de *Helminthosporium gramineum*; Wolf

\* Instituto de Biología, U.N.A.M.

(1953), obtuvo buen crecimiento de micelio en *Ustilago zaeae* en 19 aminoácidos de 23 probados como fuentes de nitrógeno. Otros trabajos que se pueden citar respecto a la utilización de las sustancias mencionadas, como fuentes de nitrógeno en el crecimiento de distintas especies de hongos, son los de Nicolás y Villanueva (1965), Bloss y Crittenden (1966), Malca, Erwin, Moje y Jones (1966), Kraft y Erwin (1967).

En el género *Fusarium* poco se ha encontrado sobre la acción de aminoácidos en distintos aspectos de la fisiología de dichos hongos. Cochrane y Cochrane (1963), dicen que entre otros factores, los macroconidios de *Fusarium solani* f. *phaseoli*, requieren para su germinación una fuente de nitrógeno, la cual fue proporcionada por diferentes

aminoácidos o por otras sustancias nitrogenadas. López y Fergus (1965), emplean aminoácidos como fuentes de nitrógeno en la nutrición de *Fusarium roseum*. Gottlieb (1946), estudia la utilización de aminoácidos como fuentes de carbono en *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* y *Penicillium roquefortii*.

El presente trabajo es una contribución al conocimiento de la nutrición en *Fusarium moniliforme*. Se estudia la posibilidad de utilizar aminoácidos como fuentes de nitrógeno, en el crecimiento de un aislamiento monospórico del mencionado hongo, se compara la producción de micelio con los distintos aminoácidos usados y también los cambios de pH en los medios después del crecimiento del hongo.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizó el mismo aislamiento monospórico de *Fusarium moniliforme* que fue empleado para probar las fuentes de carbono (Zenteno 1966). La cepa se mantuvo por sucesivas transferencias en PDA (papa dextrosa agar). Para hacer las inoculaciones en los distintos aminoácidos probados en este experimento, se sembró en Sabouraud dextrosa agar.

El medio básico usado fue también el mismo que para las fuentes de carbono, o sea el que a continuación se da (Lilly, V. G. & H. L. Barnett, 1951), utilizando como fuente de carbono la sacarosa en cantidad de 10 g por litro con todos los aminoácidos.

### Medio sintético básico

Sacarosa . . . . .	10 g
Fuente de nitrógeno . . . . .	variable
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O . . . . .	0.5 g
Fe+++ . . . . .	0.2 mg
Zn++ . . . . .	0.2 mg
Mn++ . . . . .	0.1 mg
Biotina . . . . .	5.0 µg
Tiamina . . . . .	100.0 µg
Agua destilada hasta . . . . .	1000.0 ml

Los aminoácidos probados fueron los siguientes: β-alanina, DL-alanina, glicina, DL-isoleucina, L-cistina, DL-metionina, β-fenil L-alanina, triptofano, L-ácido glutámico y una amida en 2 formas, L-asparagina y DL-asparagina (Tabla 1). Cada aminoácido se agregó al medio base en la cantidad necesaria para proporcionar 0.425 g de nitrógeno por litro de medio en un lote de prueba y en el otro, agregando al medio base completo la mitad del nitrógeno por litro.

Para cada lote en prueba se usaron tres repeticiones por aminoácido empleado. El medio con la cantidad apropiada de fuente nitrogenada en cada caso, se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 20 ml de medio.

El pH inicial en todos los medios fue de 6, menos en el que contenía ácido glutámico cuyo valor de pH fue 3. En el caso de la cistina se agregó al medio NaOH al 5% hasta obtener un pH de 9.5, al que se obtuvo una disolución completa de la sustancia. Los testigos se prepararon con medio básico sin fuente nitrogenada, 20 ml de medio en cada matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se utilizaron tres matraces para cada pH diferente correspondiente a los pH de los medios con nitrógeno, pH 3, pH 6 y pH 9.5. Preparados los medios en la forma des-

crita, se les esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 min. En ningún caso varió el pH de los medios después de la esterilización.

La inoculación de los medios con el hongo en prueba, se hizo en la forma siguiente: a un tubo con Sabouraud dextrosa agar en el que previamente se dejó crecer durante 7 días a temperatura ambiente el aislamiento monospórico de *Fusarium moniliforme* en un estudio, se le agregó agua destilada esterilizada en autoclave, a cubrir toda la superficie de crecimiento del hongo sobre el agar, se movió un poco con el asa micológica con objeto de obtener una suspensión de esporas, y después, a la flama, se inoculó cada matraz con una asada de la suspensión de esporas. Los matraces así inoculados, fueron introducidos a una incubadora a 25° C durante 14 días y en cultivo estacionario. Pasado ese tiempo se sacó el micelio de los 3 matraces de cada medio, poniendo el micelio de cada matraz sobre un círculo de papel filtro Whatman N° 3, previamente tarado, se filtró el medio sobre un embudo lavando el micelio, en cada caso, dos veces con agua destilada esterilizada. El micelio, así separado del medio, se secó en una estufa a 55°C hasta peso constante. El crecimiento del hongo se registró en peso seco, haciendo un promedio de las 3 repeticiones en cada caso.

TABLA I

Aminoácidos empleados en el ensayo. Nombres comunes y grupos a que pertenecen.

## I. Monoaminomonocarboxílicos

## a) Alifáticos

1.  $\beta$ -alanina
2. DL-alanina
3. glicina
4. DL-isoleucina

## b) Alifáticos con azufre

5. L-cistina
6. DL-metionina

## c) Aromáticos homocíclicos

7.  $\beta$ -fenil L-alanina

## d) Heterocíclicos

8. triptofano

## II. Monoaminodicarboxílicos

9. ácido-L glutámico

## Amidas de ácidos monoaminodicarboxílicos

10. L-asparagina
11. DL-asparagina

## RESULTADOS Y DISCUSION

Todos los aminoácidos proporcionados fueron utilizados por el aislamiento en prueba; pero la cantidad de micelio en peso seco producida por el hongo varió en cada uno (Tab. 2, Fig. 1).

De los aminoácidos monoaminocarboxílicos alifáticos probados, 3 de ellos y en la concentración completa aquí usada de la substancia, tuvieron rendimientos muy similares en peso seco de micelio, con excepción de la glicina que dio una mayor cantidad. En el segundo tipo de prueba, o sea con la mitad del aminoácido, la  $\beta$ -alanina y la DL-isoleucina produjeron un mayor crecimiento que en la concentración mayor,

es decir, que la mayor cantidad de la substancia hizo que el hongo creciera menos en ambos. La DL-alanina y la glicina dieron más crecimiento en la concentración mayor del aminoácido. La alanina en las dos formas usadas, tuvo un efecto contrario en las dos concentraciones; por otra parte, Ralph (1957) considera a la  $\beta$ -alanina como substancia inhibidora del crecimiento para *Alternaria solani*. En otros trabajos también se han encontrado diferencias en el crecimiento de hongos utilizando distintas concentraciones del aminoácido; así, por ejemplo, Pelletier y Keitt (1954) encontraron diversidad en la producción de micelio de *Ven-*

*turia inaequalis* proporcionando distintas cantidades de mainoácido.

De los aminoácidos alifáticos con azufre, se usaron en el presente estudio L-cistina y DL-metionina. Por los resultados obtenidos, la L-cistina fue la que produjo mayor cantidad de micelio en peso seco, de todos los aminoácidos aquí empleados y en las dos concentraciones probadas (Tab. 2, Fig. 1) y el mayor crecimiento se presentó en la concentración mayor del aminoácido. La DL-metionina dio cantidades muy semejantes de micelio en las dos concentraciones empleadas. En estos dos aminoácidos era de esperarse una utilización semejante por el hongo, ya que ambos contienen azufre, y además la metionina es paso anterior en la síntesis de la cistina. Probablemente la diferencia en los resultados se deba a que la metionina fue empleada en la forma DL que es la menos asimilable. Es interesante hacer notar el hecho de que en otras especies, la cistina se ha comportado con un efecto contrario al que aquí se encontró; Lewis (1957) considera a la cistina como substancia inhibidora del crecimiento en *Alternaria solani* y Wolf (1953) encontró ausencia de crecimiento de *Ustilago zaeae* en medio con cistina como fuente de nitrógeno.

De los aminoácidos aromáticos aquí probados, el triptófano produjo sensiblemente igual cantidad de micelio en peso seco en las dos concentraciones; además éste ocupó el segundo lugar como fuente nitrogenada en el crecimiento de *Fusarium moniliforme*. El otro aminoácido de este tipo que se empleó fue la  $\beta$ -fenil L-alanina; también en ésta la producción de micelio fue muy semejante en las dos concentraciones.

El ácido-L glutámico también dio valores muy cercanos en mg de micelio en las dos concentraciones usadas.

Con la L-asparagina y la DL-asparagina, en ambas formas se produjo mayor cantidad de micelio en el medio con la concentración completa de la substancia. Con la mitad del aminoácido, las dos formas de asparagina produjeron menos micelio, solamente que la diferencia de esta producción en el caso de la DL-asparagina fue mayor que en la otra. Además, aquí se pudo observar cómo la forma L es más asimilable que la DL.

Pelletier y Keitt (1954) encontraron variaciones en el crecimiento de *Venturia inaequalis* utilizando formas L o DL de algunos aminoácidos. Si se compara la producción de micelio, aquí obtenida, en las dos formas de asparagina, con la de los aminoácidos que soportaron el mayor crecimiento, L-cistina y triptofano (Tab. 2, Fig. 1), se podrá observar que las diferencias son bien marcadas. En cambio, si se comparan con el testigo correspondiente, pH 6, los valores no están muy distantes. Así, se puede considerar que, en el presente caso, la asparagina en las dos formas probadas, se comportó como muy mediana fuente de nitrógeno para *Fusarium moniliforme*; en cambio, en otras especies de hongos, la asparagina ha sido reconocida como buena fuente de nitrógeno Wolf, (1953); Drake y Moore, (1957); 'Chuen-Shang y Tirone, (1967), o como excelente fuente de nitrógeno Nicolás Villanueva, (1965), Sorensen y Hesseltine, (1966). En un estudio fisiológico de varias especies de *Fusarium* de la sección Elegans, Moore y Chupp, (1952) encontraron que todas las especies probadas utilizaron la asparagina como fuente de nitrógeno.

En los tres tipos de testigos usados, a los que corresponden diferentes valores de pH, se obtuvo producción de micelio en cantidades cercanas en los 3 casos.

Desde hace mucho tiempo ha sido muy discutido el hecho de que algunos hongos sean fijadores de nitrógeno. Duggar y Davis (1916), hacen una revisión muy completa de los trabajos publicados hasta esa fecha respecto a la fijación de nitrógeno por los hongos. Entre esos trabajos, citan el de Pennigton de 1908, quien estudió varios hongos en los que encontró fijación de nitrógeno, entre los que menciona dos especies de *Fusarium*. El hecho de haber obtenido, en el presente experimento, una producción de micelio en los testigos, muy cercana a la cantidad que se obtuvo con algunos de los aminoácidos ensayados, hace pensar en la posibilidad de que el hongo en cuestión, sea fijador de nitrógeno, lo cual requeriría una comprobación posterior, tratando de eliminar las posibilidades de error, una de las cuales puede ser la forma de inoculación de los medios con una suspensión de esporas,

en las que se debe haber incluido una cierta cantidad de nitrógeno. López y Fergus (1965), estudiando la nutrición de *Fusarium roseum* registran producción de micelio en los testigos, aunque en el trabajo no hacen ningún comentario al respecto; pero como dato adicional se puede mencionar que una de las formas que ellos emplearon para inocular los medios fue una suspensión de esporas.

Por lo que se refiere a los cambios de pH en los medios, como se puede observar en la Tabla 2, en casi todos varió, aunque fuera ligeramente, con respecto al pH inicial; no hubo cambio en los testigos con pH 6, pH 3 y L-asparagina en la concentración completa de la fuente nitrogenada. Las variaciones más grandes en pH fueron en el ácido L-glutámico y L-cistina, en los que al iniciarse el experimento se cambió el pH de 6 a pH 3 y pH 9.5 respectivamente, para disolver completamente el aminoácido.

Los valores de pH a que se sometió el hongo fueron bien diferentes desde un principio y, además, en algunos se presentaron cambios considerables durante el crecimiento (Tab. 2); sin embargo, en ninguno de los pH probados se presentó falta de crecimiento, lo cual indica que la especie en prueba es capaz de crecer en muy variados grados de pH; López y Fergus (1965), tampoco encontraron valores de pH inhibidores del crecimiento en *Fusarium roseum*.

Sintetizando los resultados, se podría considerar que el aminoácido que favoreció más el crecimiento del aislamiento probado de *Fusarium moniliforme*, fue la L-cistina, en las dos concentraciones usadas, comparada con los otros aminoácidos y con los testigos. En segundo lugar estaría el triptofano, seguido por la glicina y ácido L-glutámico. Con el triptofano y el ácido L-glutámico, la producción de micelio, como ya se ha señalado, es muy semejante en las dos concentraciones. En la glicina la producción es algo más alta en la mayor concentración del aminoácido. En los otros aminoácidos la producción de micelio fue muy cercana a la de los testigos.

Por lo que respecta a la diferencia de micelio en peso seco, en las de dos diferentes

concentraciones del aminoácido, no se encontró el mismo resultado en todos los casos, como se ha expuesto anteriormente, pues mientras que en unos aminoácidos se obtuvieron rendimientos semejantes en las dos concentraciones, como son la DL-metionina, el triptofano y tal vez el ácido L-glutámico y la  $\beta$ -fenil L-alanina, la mayor cantidad de micelio se logró en la concentración completa del aminoácido, como es el caso de DL-alanina, glicina, L-cistina, L-asparagina y DL-asparagina; en cambio, con  $\beta$ -alanina y DL-isoleucina la producción de micelio fue algo más alta en la menor concentración del aminoácido.

Los valores de pH que se usaron fueron de muy distintos grados desde el principio del experimento, además hubo variaciones, en algunos casos muy marcadas, durante el crecimiento del hongo; pero en ningún valor de pH se presentó falta de desarrollo del micelio.

Terminadas las pruebas de laboratorio, se procedió a elaborar los análisis estadísticos de los datos obtenidos, los cuales confirmaron los resultados expuestos anteriormente.

Los análisis estadísticos consistieron en:

I. Tabla de análisis de varianza para evaluar los efectos del pH sobre el crecimiento del hongo, en los testigos.

II Tabla de análisis de varianza para comparar el efecto de las distintas sustancias nitrogenadas sobre el crecimiento del hongo.

III. Tabla de análisis de comparación múltiple con nivel de significancia de 5% y cálculo de la diferencia significativa mínima (DSM), para evaluar la diferencia entre tratamientos.

IV. Aplicación de la técnica de contrastes entre los testigos con los diferentes grupos de aminoácidos y entre los grupos mismos.

Para cada punto de los anteriores se concluyó lo siguiente:

I. No hubo diferencia significativa entre los 3 valores de pH empleados en los testigos. Por esto se decidió usar para los otros cálculos el promedio de los tres pH que fue de 32.1 mg de micelio.

II. Según la tabla de F hay diferencia grande entre los distintos tratamientos, con valor de 22.69 » que 3.18. (11 y 22) 0.01.

III. Siendo la diferencia muy marcada entre los tratamientos, se calculó la DSM que fue de 10.06 al 5%, para evaluar los resultados obtenidos en la tabla de análisis de comparación múltiple. La cistina y el triptofano demostraron ser los más favorables para el crecimiento del hongo, habiendo DSM entre los dos.

IV. Mediante la técnica de contrastes con sistemas ortogonales, se contrastaron los siguientes tratamientos:

- 1) testigo X todos
- 2) alifáticos X aromáticos
- 3) alifáticos con azufre X alifáticos sin azufre

- 4) ácido glutámico X alifáticos sin azufre
- 5) L cistina X DImetionina
- 6)  $\beta$  alanina + DL alanina X glicina + isoleucina
- 7) glicina X isoleucina
- 8) triptofano X  $\beta$  fenil alanina
- 9) amidas X alifáticos
- 10)  $\beta$  alanina X DL alanina
- 11) L asparagina X DL asparagina

Numéricamente se concluyó que de los grupos contrastados, el del grupo de los aminoácidos alifáticos con azufre dio el mayor resultado, con lo cual se comprobó una vez más la acción favorable de la cistina en el desarrollo del hongo estudiado.

#### LITERATURA CITADA

- BLOSS, HE. & CRITTENDEN, H. W. 1966. Effect of amino acids and sugars on growth of *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* in liquid culture. *Phytopathology* 56: 92-94.
- CHUNG, CHUEN-SHANG & TRIONE, E. J. 1967. Organic and inorganic nutrition of *Trilletia controversa*. *Phytopathology* 57: 315-319.
- COCHRANE, J. C. & COCHRANE, V. W. 1963. Spore germination and carbon metabolism in *Fusarium solani*. I Requeriments for spore germination. *Phytopathology* 53: 1155-1160.
- CONVERSE, R. H. 1953. The influence of nitrogenous compounds on the growth of *Helminthosporium gramineum* in culture. *Mycologia* 45: 335-344.
- DRAKE, C. R. & MOORE, L. D. 1957. The effect of various nitrogen sources on growth of *Botryosphaeria ribis* in vitro. *Phytopathology* 57: 645.
- DUGGAR, B. M. & DAVIS, A. R. 1916. Studies in the physiology of fungi. *Ann. Missouri bot. Gdn.* 3: 413-437.
- GOTTLIEB, D. 1946. The utilization of amino acids as a source of carbon by fungi. *Arch. Biochem.* 9: 341-351.
- KRAFT, J. M. & ERWIN D. C. 1967. Effects of nitrogen sources on growth of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 57: 374-376.
- LEWIS, R. W. 1957. Amino acid nutrition of *Alternaria solani*. *Phytopathology* 47: 121-125.
- LÓPEZ, M. E. & FERGUS, C. L. 1965. The carbon and nitrogen nutrition of *Fusarium roseum*. *Mycologia* 57: 897-903.
- MALCA, I.; ERWIN, D. C.; MOJE, W. & JONES, B. 1966. Effect of pH and carbon and nitrogen sources on the growth of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 56: 401-406.
- MOORE, H. & CHUPP, C. 1952. A Physiological study of the fusaria causing tomato, cabbage and muskmelon wilts. *Mycologia* 44: 523-531.
- NICOLÁS, G. & VILLANUEVA, J. R. 1965. Physiological studies on the rust hyperparasite *Darlucula Filum*. I. Carbon and nitrogen nutrition. *Mycologia* 57: 782-788.
- PELLETIER, R. L. & KEITT, G. W. 1954. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. VI. Amino acids as sources of nitrogen. *Am. J. Bot.* 41: 362-371.
- SORENSEN, W. G. & HESSELTINE, C. W. 1966. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia* 58: 681-689.
- WOLF, F. T. 1953. The utilization of carbon and nitrogen compounds by *Ustilago zeae*. *Mycologia* 45: 516-522.
- ZENTENO Z., M. 1966. Estudios sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. V. Efecto de distintas fuentes de carbono en *Fusarium moniliforme* Sheld. *An. Inst. Biol. Univ. México* 37: 71-74.

TABLA 2

Peso seco de micelio en mg, de *Fusarium moniliforme*. Promedio de tres repeticiones en dos concentraciones de distintas fuentes de nitrógeno y pH inicial y pH final

Nombre	mg de micelio en concentración completa	mg de micelio en media concentración	pH inicial		pH final	
			concentr. completa	media concentr.	concentr. completa	media concentr.
$\beta$ -alanina	52.8	59.5	6.0	6.0	6.5	5.0
DL-alanina	51.8	36.9	6.0	6.0	7.0	5.0
glicina	69.7	54.1	6.0	6.0	3.0	3.0
DL-isoleucina	47.1	54.1	6.0	6.0	7.0	7.0
L-cistina	91.6	78.6	9.5	9.5	3.0	3.2
DL-metionina	41.9	41.8	6.0	6.0	5.0	4.0
$\beta$ -fenil L-alanina	54.4	58.7	6.0	6.0	6.5	5.0
triptofano	77.8	77.1	6.0	6.0	5.0	5.5
Acido L-glutámico	64.0	60.7	3.0	3.0	6.5	4.5
L-asparagina	53.0	44.8	6.0	6.0	6.0	5.0
DL-asparagina	49.1	33.2	6.0	6.0	6.5	7.0
Testigo pH 9.5	31.3		9.5		8.0	
Testigo pH 6.0	34.0		6.0		6.0	
Testigo pH 3.0	31.2		3.0		3.0	

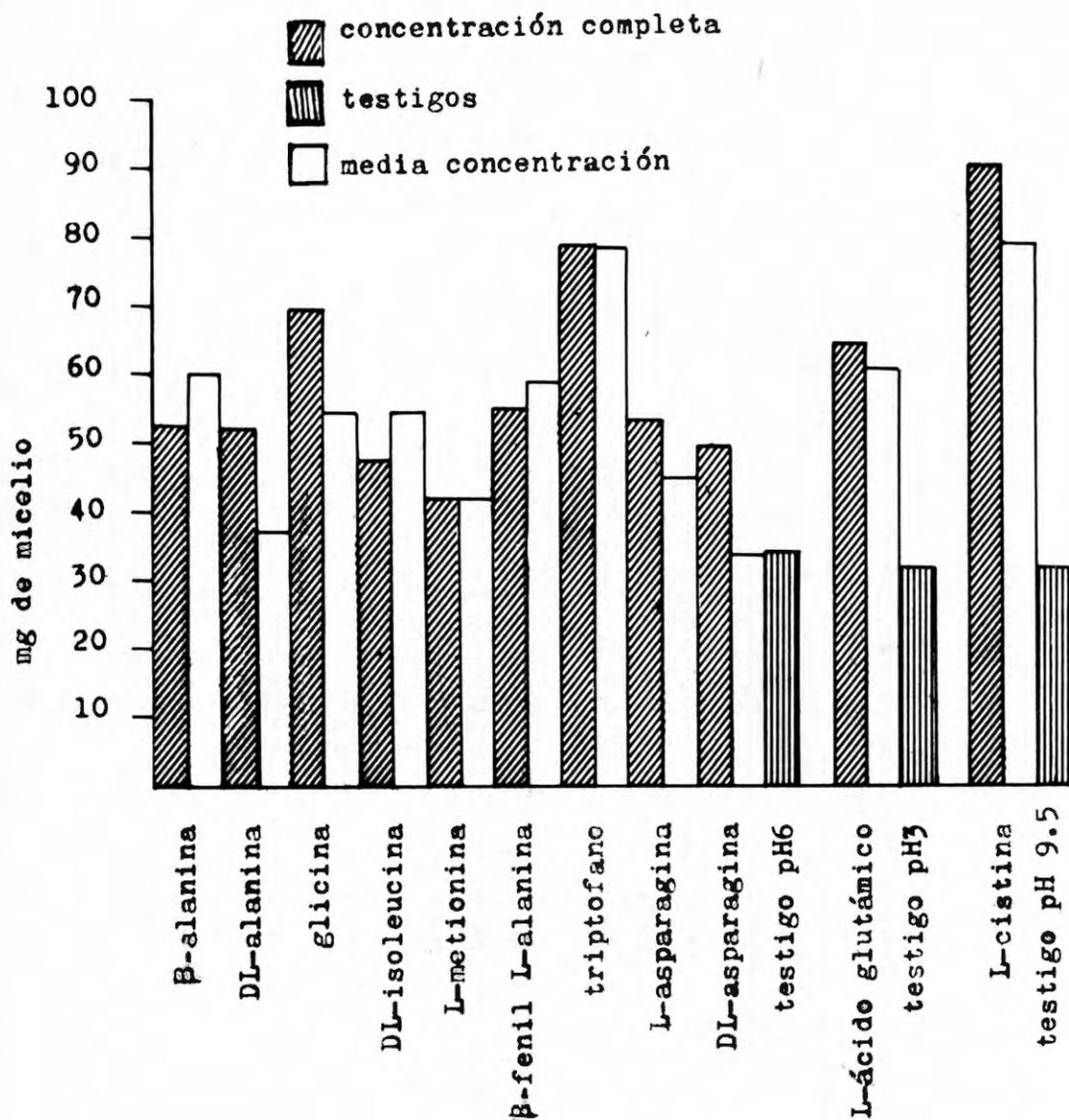


Fig. 1. Peso seco de micelio, en mg de *Fusarium moniliforme*, con distintas fuentes de nitrógeno.