# سیتولوژی *Ustilago maydis*

محبوبه یزدانی[۱]* و سید علی موسوی جرف[۲]

*۱- **نویسنده مسؤول**: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاهپزشکی، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
(Yazdanimahboobe@yahoo.com)
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۲

## چکیده

**رفتار هسته در تلیوسپور، بازیدیوسپور و میسلیوم‌های *Ustilago maydis* مورد بررسی قرار گرفت. جهت کشت تلیوسپورها از محیط PDA + ۱۰٪ دکستروز استفاده گردید. مطالعه رفتار هسته با استفاده از میکروسکوپ اپی-فلورسنت و رنگ‌آمیزی با دو رنگ اتیدیوم برماید و اکردین اورنج صورت پذیرفت. هسته در تلیوسپور کروی و بزرگ و اکثر فضای داخلی آن را اشغال نموده است. بازیدیوسپورها (اسپوریدیوم) به صورت غیرانگلی و به روش جوانه‌زنی رشد می‌کنند و بازیدیوسپورهای جوانه‌زده با زاویه °۳۵ الی °٤٥ از اسپوریدیوم مادری قرار دارند. هسته در بازیدیوسپور بیضوی شکل و در هنگام تشکیل اسپوریدیوم جدید، به محل تشکیل اسپوریدیوم مهاجرت و پس از تقسیم میتوز یک هسته به درون اسپوریدیوم در حال تشکیل منتقل می‌شود. ریسه‌ها درون بافت آلوده به دو صورت مشاهده شدند. برخی دوهسته‌ای و ظریف و به اشکال متفاوت شاخه‌های متورم درون سلولی تا زوائد انگشت مانند و برخی ریسه‌ها در محل تشکیل تلیوسپور تک‌هسته‌ای و ضخیم و دیپلوئید بودند. ریسه‌های *U. maydis* حاصل از کشت بافت آلوده در محیط کشت عموماً دوهسته‌ای و هسته‌ها در ارتباط نزدیک با یکدیگر و در نزدیکی دیواره سلولی قرار داشتند. درون حفره‌های مملو از تلیوسپورهای جوان و بالغ، همه ریسه‌ها در حال تبدیل شدن به تلیوسپور بودند و ریسه دو هسته‌ای مشاهده نگردید.**

***کلید واژه‌ها: Ustilago maydis، سیتولوژی، تلیوسپور، بازیدیوسپور (اسپوریدیوم)، ریسه دوهسته‌ای، ریسه تک‌هسته‌ای***

## مقدمه

عامل بیماری سیاهک معمولی ذرت قارچ *Ustialgo maydis* (D.C.) Corda (Syn= *U. zea* Ung) می‌باشد. از خصوصیات بارز این قارچ زادآوری زیاد و دوام نسبتاً طولانی تلیوسپورهای آن، تغییر پذیری زیاد در نحوه زندگی و علائم خاصی است که در گیاه ایجاد می‌کند. به طور کلی تعداد اسپورهای موجود در یک سانتی متر مکعب گال آن را ۲۵-۶ میلیارد تخمین می‌زنند و دوام آنها بین ۷-۵ سال گزارش شده است (۳، ۱۰ و ۲۱). تلیوسپورها زیتونی تا قهوه‌ای سیاهرنگ، بیضوی بی‌نوک و خاردار به قطر ۱۱-۸ میکرومتر می‌باشند (۱). تلیوسپورهای دیپلوئید پس از یک تقسیم میوز، که در درون تلیوسپور صورت می‌گیرد، جوانه‌زده و تولید یک بازیدیوم چهار سلولی می‌کنند، از هریک از سلول‌ها یک بازیدیوسپور (اسپوریدیوم) بیضی شکل و یک هسته بیرنگ به وجود می‌آید. بازیدیوسپورها به طور جانبی یا انتهایی تولید می‌شوند و اغلب نیمه

بالایی بازیدیوم از نیمه پایینی آن جدا می‌گردد (۴). معمولاً دوتا از این بازیدیوسپورها از یک تیپ آمیزشی و دوتای دیگر از تیپ آمیزشی سازگار مخالفند (۵، ۱۳ و ۲۴). بعد از جوانه زدن بازیدیوسپورها تولید یک ریسه باریک هاپلوئید می‌نمایند که به طور غیرانگلی زندگی می‌کند و احتیاج به آمیزش با ریسه از نوع جنسی سازگار دیگر دارد تا بتواند در گیاه عفونت واقعی به وجود آورد (۶). پس از آلوده ساختن میزبان عمل دیکاریوتیزاسیون[1] در نسوج میزبان به طریق سوماتوگامی[2] انجام می گیرد. این قارچ از لحاظ جنسی چهار قطبی می‌باشد (۱۲). ریسه دو هسته ای در چرخه زندگی قارچ نقش اساسی دارد. ریسه تک هسته‌ای به نظر می‌رسد عمر کمتری داشته و به ندرت زیاد رشد می‌کند. این ریسه اصولاً فاقد قلاب اتصال بوده و تلیوسپور تولید نمی کند (۱۳). میسلیوم سیاهک به فراوانی در میزبان توسعه نمی‌یابند ولی در بعضی مراحل به مقدار قابل ملاحظه‌ای در میزبان پخش می‌گردند (۲). اختلاف بسیار زیادی بین مطالعات موجود در رابطه با این سوأل که آیا رشد ریسه در میزبان درون سلولی است یا بین سلولی است وجود دارد (۲۸). به هر حال گزارشات حاکی از این حقیقت است که ریسه قارچ در بیشتر موارد بین سلولی است و اغلب هیچ علائمی قبل از اسپورزائی در میزبان آلوده دیده نمی‌شود (۲۷و ۲۸). این قارچ می تواند هر بافت مریستمی را از گیاه میزبانش آلوده کند. میسلیوم دو هسته ای در میزبان سیستمیک نشده ولی به سرعت در محل‌های آلودگی که شامل برگ‌های جوان، جوانه‌های جانبی و بلال در حال رشد می‌باشد، گسترش می‌یابد. اسپورزایی در این محل‌ها، گاهی حتی ۱۰ روز پس آلودگی بروز می‌کند (۲۹). این قارچ دوشکلی[3] بوده به طوری که در خارج از میزبان مخمر مانند و با جوانه زدن رشد می‌کند و در داخل میزبان به فرم ریسه‌ای تغییر شکل می‌دهد، برای این تغییر شکل به موادی نظیر کیتین نیازمند است (۱۷). این قارچ از نظر ژنتیکی هتروتال چهار قطبی است و برای ایجاد بیماری نیازمند سویه سازگار که دارای آلل های متفاوت می‌باشد است (۱۳).

## مواد و روش‌ها

### ۱- تلیوسپور و اسپوریدیوم

قرص‌های آب آگار ۲٪ حاوی تلیوسپور جوانه‌زده روی اسلایدهای میکروسکوپی پوشانده شده با چسب Haupt و فرمالین ۴٪ (به نسبت ۱: ۴۰) قرار گرفته و در آون $^{o}C$ ۴۵-۴۲ به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند (۱۶) و یا اینکه تلیوسپورهای جوانه‌زده در تشتک‌های پتری جهت تثبیت با محلول ۴ ٪ فرمالدهید در سوکروز M ۲۵/. به مدت حداقل ۱۸ ساعت در دمای $^{o}C$ ۵ پوشانده شدند و سپس در اتانول ۷۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای $^{o}C$ ۵ مجدداً تثبیت و سپس دو مرتبه با آب مقطر سترون شسته شده و به آلبومین منتقل و در آون $^{o}C$ ۴۵-۴۲ به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند (۳۰).

برای رنگ‌آمیزی هسته از اتیدیوم بروماید (باغلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱M و pH=۷/۲) و اکراین اورنژ (با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱M، pH=۶/۰) استفاده شد (۱۸). نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به این ترتیب با میکروسکوپ Olympus مدل BX51 مجهز به کندانسور اپی فلورسانس و به ترتیب با fluorescence cube از نوع WG (520-545 nm excitation wavelength) و WB (490-500 nm excitation wavelength) بررسی شدند.

1- Dikaryotization
2- Somatogamy
3- Dimorphic

**۲- جداسازی و کشت ریسه‌های دو هسته ای**

گال‌های آلوده از گیاه ذرت بیمار جمع‌آوری و با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند. پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر سترون، به صورت عرضی دو نیم شدند و بر روی محیط PDA به همراه ۱۰٪ دکستروز و یا محیط سیب زمینی + ۱۰٪ دکستروز + ۱۰٪ گلیسرین قرار داده شدند (۱۵). کشت‌ها در دمای $^{o}C$ ۲۵ و ۱۲ ساعت نور متناوب در انکوباتور قرار داده شدند. به منظور رنگ-آمیزی و بررسی‌های میکروسکوپی از روش‌های ذکر شده استفاده شد.

**۳- میسلیوم های تلیوسپورزا در بافت میزبان**

بافت‌های آلوده به فواصل ۲، ۴، ۷، ۱۱ و ۲۵ روز پس از مایه‌زنی جمع‌آوری و در محلول ۴٪ فرمالدهید در سوکروز M ۰/۲۵ و سپس در اتانول ۷۰٪ تثبیت شده و سپس آب‌گیری و شفاف‌سازی با سری درجه‌بندی شده اتانول- زایلن صورت گرفت. پس از آن نمونه‌ها در پارافین $^{o}C$ ۵۸-۵۶ قرار داده شدند (۳۰). مقاطعی به ضخامت ۱۰-۷ میکرومتر بوسیله میکروتوم دوار از آنها تهیه شد. مقاطع روی اسلاید حاوی حسب آلبومین گلیسرین قرار داده شدند، در دمای $^{o}C$۴۲-۴۰ خشک و با زایلن، پارافین زدایی شدند. نمونه‌ها از سری درجه بندی اتانول تا آب گذرانده و مانند روش‌های ذکر شده در بند ۱ رنگ‌آمیزی و مطالعه شدند (۱۸).

## نتایج

**۱- تلیوسپور و اسپوریدیوم:**

هسته‌های تلیوسپورها در رنگ‌آمیزی با هر دو ماده رنگی اتیدیوم برماید و اکریدین ارنج کاملاً گرد و به نظر می‌رسید که کل فضای داخلی تلیوسپور را اشغال نموده است (شکل ۱-A و B). چهار الی شش ساعت پس از کشت تلیوسپورها روی محیط غذایی اسپوریدیوم‌ها نخی شکل یک هسته‌ای (شکل ۱-C وD ) و در برخی موارد دو هسته‌ای به نظر می‌رسید که احتمالاً در حال جوانه‌زدن و تقسیم هسته‌ها می‌باشند (شکل ۲-B)، شکل گرفت. رشد روی محیط مایع حاوی گلیسرین راحت‌تر و سریع‌تر صورت پذیرفت. اسپوریدیوم‌های جوانه‌زده با زاویه $^{o}$۳۵ الی $^{o}$۴۵ نسبت به اسپوریدیوم مادری قرار داشتند (شکل۲-C و D).

**۲-سیتولوژی ریسه‌های پنبه‌ای تولید شده در محیط غذایی مصنوعی:**

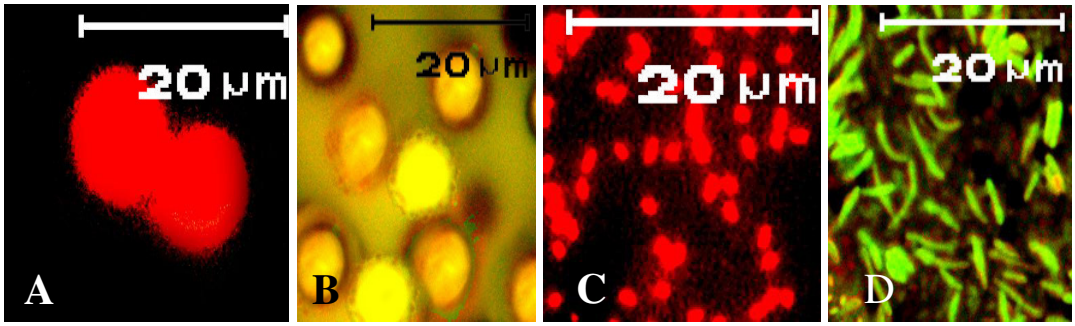
ریسه جدا شده در محیط کشت دو هسته ای بود (شکل۳) و هسته‌های آنها تقریباً گرد تا بیضوی شکل مشاهده شدند. تقریباً در همه موارد هسته‌های ریسه‌های اسپورزا بصورت دوتایی و در ارتباط نزدیک با هم مشاهده شدند. زاویه انشعابات از تقریباً راست تا یک جداره عرضی Y شکل از ریسه مادری متغیر بود (شکل۴-C).

**۳-سیتولوژی میسلیوم تلیوسپورزا و تلیوسپورها در مقاطع بافت میزبان:**

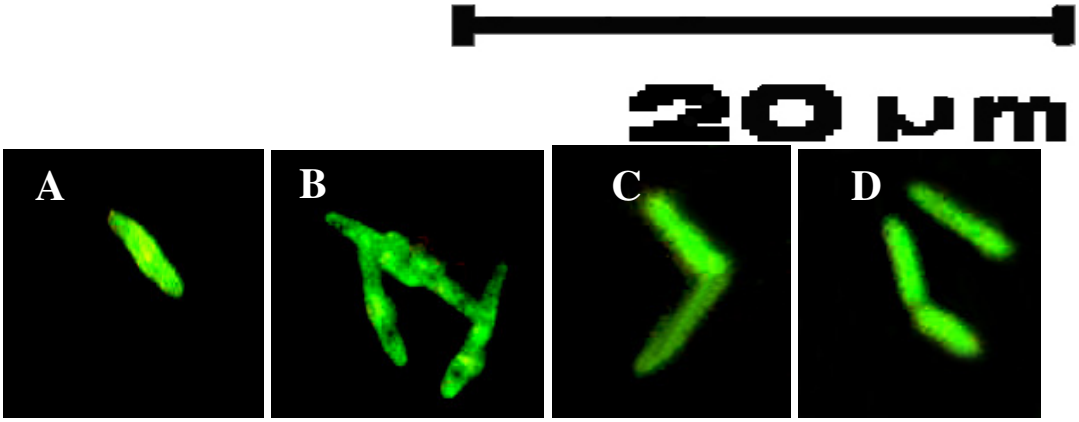
میسلیوم اسپورزا در به ترتیب ۲، ۴، ۷ و ۱۱ روز پس از مایه‌زنی و به ندرت در مرحله ایجاد علایم مشاهده گردیدند (شکل۴).

ریسه‌های جوان، دو هسته ای و بدون دیواره ضخیم مشاهده شدند (شکل۴) در صورتی که ریسه‌های مسن‌تر به صورت منوکاریوتیک و دارای دیواره ضخیم‌تر بودند و به عنوان دیپلوئید فرض شدند (شکل ۵). هرچند یافتن هسته در ریسه درون بافت آلوده مشکل بود.

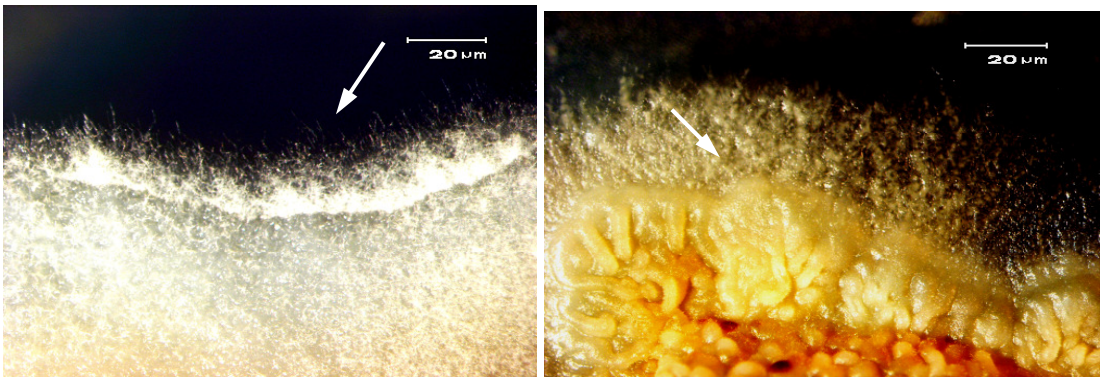
هفت روز پس از مایه‌زنی و با پیشرفت آلودگی ریسه منشعب شده و وارد فضای سلولی شدند. این انشعابات شکل‌های متفاوتی داشتند؛ برخی ساده و به نظر می‌رسید ریسه‌هایی هستند که رشد آنها ادامه دارد (شکل ۶-C)، برخی شاخه‌های بین سلولی متورمی بودند و برخی دیگر به صورت انگشت‌مانند خاتمه یافته بودند و یا به نوعی متورم گشته بودند (شکل۶-B).



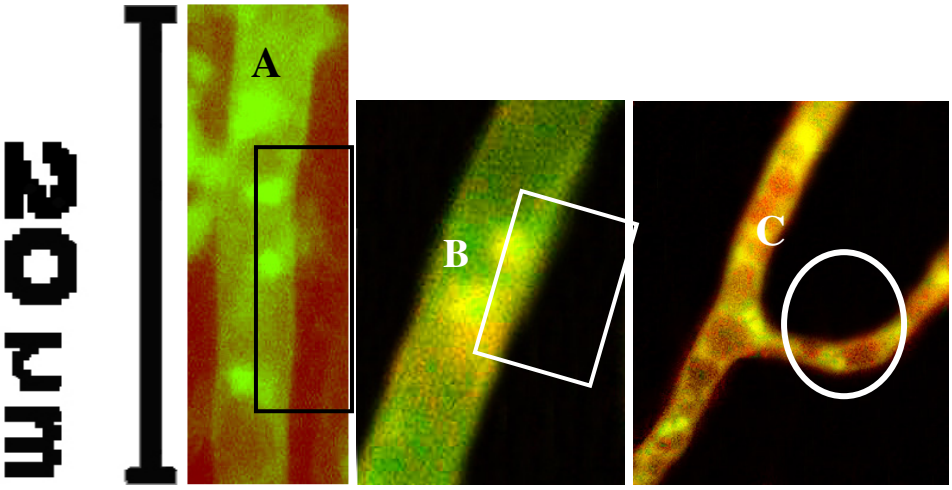

**شکل ۱- هسته تلیوسپورهای *Ustilago maydis* در رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید (A) و اکریدین اورنج (B) به نظر می‌رسد کل فضای داخلی تلیوسپور را اشغال نموده است. شکل C و D اسپوریدیوم و هسته آن را در رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید (C) و اکریدین اورنج (D) نشان می دهد.**



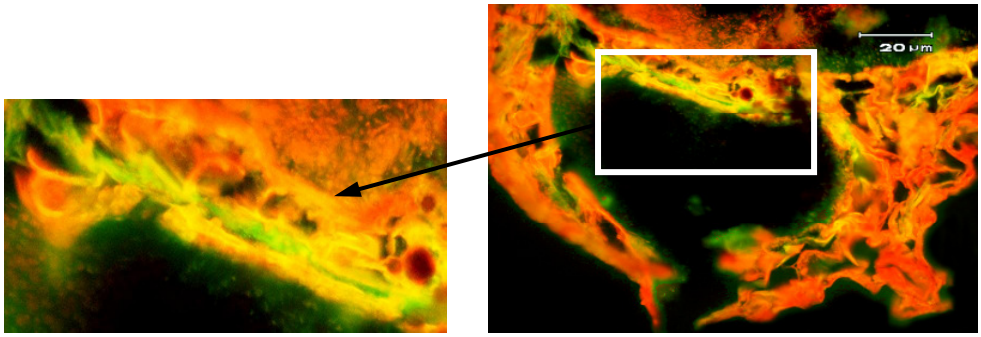

**شکل ۲- اسپوریدیوم *Ustilago maydis*: درحال جوانه زدن از A تا D.**



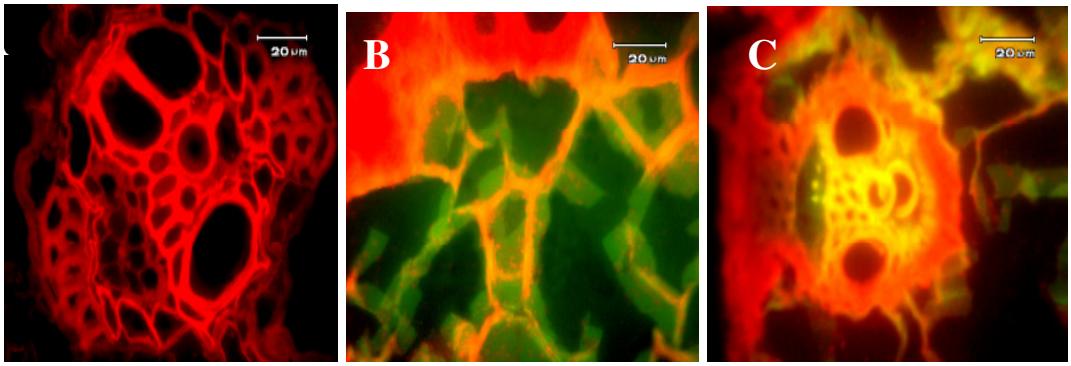

**شکل ۳- تشکیل میسلیوم‌های قارچ *Ustilago maydis* در محیط کشت.**
**ریسه‌های باریک ایجاد شده با پیکان نشان داده شده است.**




**شکل ٤- ریسه‌های دو هسته ای *UStilago maydis* جدا شده از بافت آلوده میزبان. هسته‌ها با علامت نشان داده شده است. انشعاب Y شکل در شکل C نشان داده شده است**




**شکل ٥- تشکیل تلیوسپور *Ustilago maydis* درون بافت میزبان به همراه ریسه‌های مسن احاطه-کننده حفره‌ای که در آن تلیوسپورها در حال شکل‌گیری هستند.**
**ریسه مسن ضخیم و مونوکاریون با علامت پیکان نشان داده شده است**




**شکل٦- گسترش ریسه *Ustilago maydis* در بافت آلوده در مقایسه با بافت سالم A. برخی ساده و به نظر می‌رسید ریسه‌هایی هستند که رشد آنها ادامه دارد (C)، برخی شاخه‌های بین سلولی متورمی بودند (B)**

## بحث

در این مطالعه انتقال از مرحله دیپلوئید به هاپلوئید منوکاریوتیک و سپس به مرحله دو هسته ای که در طول دوره زندگی *Ustilago maydis* رخ می‌دهد، بررسی شده است.

تلیوسپورهای در حال استراحت *U. maydis* تقریباً گرد ۸-۱۱ میکرومتر می باشند رامبرگ و مک لافلین[1] (۲۳) ۳ لایه دیواره سلولی را در آن تشخیص دادند. دونالدسون و سالی[2] (۱۴) بیان کردند که هسته در تلیوسپور اکثر فضای داخلی را اشغال کرده است و از نظر بیوشیمیایی و فیزیولوژیک غیرفعال می‌باشد. اشغال اکثر فضای داخل سلولی توسط هسته با نتایجی که از حضور هسته در تلیوسپورحاصل شد مطابقت داشت.

رفتار هسته در چرخه سلولی قارچ توسط فیشر و هولتن[3] (۱۵) توصیف شده و شامل سه فاز اصلی می‌باشد؛ دیپلوفاز، مرحله تک‌هسته‌ای و مرحله دو-هسته‌ای. فاز دیپلوئید یا دیپلوفاز زمانی آغاز می‌شود که دو هسته مرحله دوهسته‌ای با هم ترکیب و تشکیل هسته دیپلوئید را می‌دهند. فاز هاپلوئید یا مرحله تک‌هسته‌ای از زمان انجام تقسیم میوز آغاز و با ترکیب شدن سلول‌های تک‌هسته‌ای به فاز دوهسته‌ای وارد می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که هسته درون تلیوسپور تک هسته‌ای می‌باشد. این هسته احتمالاً دیپلوئید بوده و پس از تقسیم میوز وارد مرحله مرحله تک هسته ای می‌شود. مرحله تک هسته ای تا زمان وارد شدن به میزبان ادامه می‌یابد.

القاء جوانه‌زنی و میوز با قرار دادن تلیوسپور در محیط‌های غنی نظیر محیط‌هایی حاوی ساکاروز[4]، رافینوز[5] یا ملیزیتوز[6] امکان پذیر می‌باشد (۹). در این پژوهش القاء این عمل با اضافه کردن ۱۰ درصد دکستروز[7] بیشتر به محیط مایع سیب زمینی/ دکستروز / گلیسرین به منظور رشد بهتر قارچ صورت پذیرفت. استفاده از محیط های مایع برای بهبود رشد قارچ‌های سیاهک پیشتر توصیف شده بود (۱۵ و ۲۲). در طبیعت وجود مواد خاص درون میزبان باعث القاء جوانه‌زنی قارچ می‌شوند. کالتریدر و گوتلیب[8] (۹) سطوح بالای ساکاروز در بافت‌های آلوده را عامل تحریک تلیوسپور برای جوانه‌زنی برشمرند. در *U. maydis* میوز و جوانه‌زنی تلیوسپور به طور همزمان با هم مربوط می‌باشند. جوانه‌زنی تلیوسپورها در محیط مصنوعی به صورت غیر-همزمان صورت پذیرفت. چهار تا شش ساعت بعد از جوانه‌زنی تلیوسپور متابازیدیوم ایجاد گردید. آنالیز هسته‌ها در تلیوسپور و پیش‌میسلیوم (متابازیدیوم) نشان داد که بعد از شکل‌گیری متابازیدیوم هسته به درون آن منتقل شدند، این نتایج، نتایج رامبرگ و مک‌لافلین (۲۳) را در رابطه با فعالیت تلیوسپور پس از جوانه‌زنی تائید می‌کند. هر سلول متابازیدیوم با جوانه‌زنی تولید بازیدیوسپور کرد و سپس رشد به صورت غیرانگلیی و از طریق جوانه‌زنی (تقسیم میتوزی) ادامه یافت. در این پژوهش اسپوریدیوم-هایی مشاهده گردید که در مراحل ابتدایی جوانه‌زنی بودند به این مفهوم که تقسیم هسته‌ها صورت گرفته بود ولی هنوز دیواره سلولی بین هسته‌ها شکل نگرفته بود و به نظر سلول های بلندی بودند که دو هسته‌ای به نظر می‌رسیدند. جوانه ایجاد شده با زاویه $30^{o}$ الی $45^{o}$ نسبت به اسپوریدیوم مادری قرار گرفته بودند این نتایج با یافته‌های استنتسلر[9] (۲۵) تطابق داشت.

در این پژوهش همچنین میسلیوم های دو هسته ای در محیط کشت مایع حاوی گلیسرین و

1- Ramberg & Mclaughlin
2- Donaldson & Saville
3- Fischer & Holton
4- Sucrose
5- Raffinose
6 -Melezitose
7- Dextrose
8- Caltrider & Gottlieb
9- Snetselaar

۱۰٪ دکسترز مشاهده گردید. در این میسلیوم‌های دو هسته‌ای هسته‌ها در رابطه نزدیکی با یکدیگر قرار داشتند و دیواره سلولی در ریسه کاملاً مشهود بود. فیشر و هولتن نیز (۱۵) جفت شدن اسپوریدیوم و ایجاد میسلیوم دو هسته ای دو هسته‌ای را در محیط کشت گلیسرین آگار توصیف کردند. کریستینسن[1] (۱۱) نیز بیان می‌کند که همه اسپوریدیوم‌های ایجاد شده در ابتدا یک سلولی هستند و در صورت جفت شدن میسلیوم دوهسته‌ای تشکیل می‌دهند. اسلومر (۱۵) برای اولین بار ثابت کرد که اسپوریدیوم‌های *U. maydis* در محیط قادر به جفت شدن شدن با یکدیگر به وسیله مهاجرت هسته از یک اسپوریدیوم به دیگری و در نتیجه ایجاد فاز دو هسته ای می‌باشند. باومن [2] (۷) با تایید این مسئله بیان کرد که پس از ترکیب شدن هسته-ها ریسه دو هسته ای شکل می‌گیرد و از طریق تقسیم معمولی (تقسیم میتوزی سلول‌ها) ریسه دو هسته ای رشد می‌کند (۷ و ۸). هنگامی که مخلوط تلیوسپورهای جمع شده از مناطق مختلف استان خوزستان با هم ترکیب شدند و روی محیط ذکر شده کشت داده شدند، واکنش جفت شدن بین آنها صورت گرفته و ریسه دو هسته ای دو هسته‌ای از محیط قابل جداسازی بود. مشاهده ریسه دو هسته ای در محیط کشت توسط استنسلر (۲۵) نیز توصیف شده بود.

ریسه‌های جدا شده حاصل از گال‌های آلوده همه دو هسته‌ای و در محیط مایع به خوبی قادر به رشد و توسعه بودند. ریسه‌های درون سلولی مشاهده شده در این پژوهش در ابتدا و قبل از تشکیل تلیوسپورها دو هسته‌ای و دو هسته ای و پس از آن و در محل تشکیل تلیوسپورها یک هسته و دیپلوئید فرض شدند. این نتایج با یافته‌های قبلی استنسلر (۲۵)، استنسلر و مک‌کن[3] (۲۶) و استنسلر و میمز[4] (۲۷، ۲۸ و ۲۹) تطابق دارد.

در روند تلیوسپورزایی مشخص شد که تولید تلیوسپور در این قارچ به این صورت است که ریسه های اسپورزا قطعه قطعه می‌شوند و هر قطعه منشاء یک تلیوسپور آغازین است و ریسه‌های اسپورزا تماماً به تلیوسپورهای جوان تبدیل می شوند، لذا این پدیده در *U. maydis* با آنچه که برای تیپ *Ustilago* توصیف شده است (۲۰) مطابقت دارد. در مقایسه با تولید تلیوسپور در تیپ *Tilletia* که در آن تلیوسپور تنها در برخی قسمت‌های ریسه‌های اسپورزا تولید می‌شود (۱۹).

مطالعه سیتولوژی *U. maydis* درک صحیحی را در رابطه با چرخه سلولی و رفتار هسته در خارج و درون میزبان فراهم کرده است.

1- Christensen
2- Bowman
3- Snetselaar & McCann
4- Snetselaar & Mims

## منابع


۱. اخوت، س. م. ۱۳۷۸. بیماری‌های غلات (جو، گندم، برنج، ذرت، ذرت خوشه‌ای). موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران؛ ۴۷۵ ص.

۲. پیغامی، الف. ۱۳۸۱. قارچ شناسی تکمیلی. انتشارات احرار تبریز، ۴۱۷ ص.

۳. حبیبی، ج.، و زمانی، م. ۱۳۸۲. آفات و بیماری‌های مهم ذرت در ایران و مدیریت تلفیقی آن‌ها. نشر آموزش کشاورزی، ۱۵۶ص.

۴. شریف نبی، ب.، و نکویی، الف. ۱۳۷۳. بروز سیاهک معمولی ذرت در استان اصفهان. بیماری‌های گیاهی، جلد۳۰، شماره‌ی ۲، صص ۸۰-۸۱.

۵. صارمی، ح.، پیغامی، الف.، و پژوهنده، م. (مترجم). ۱۳۸۱. اصول قارچ‌شناسی. جهاد دانشگاهی مشهد، ۶۸۰ ص.

6. Agrious, G.N. 2005. Plant Pathology, 922 p. 5th ed.

7. Bowman, R. 1946. Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. Journal of Agriculture Research, 72: 233-243.

8. Bowman, R. 1940. Cytological study of sporidial fusion in *Ustilago zeae*.(Abstract). Phytopathology, 30: 3.

9. Caltrider, P.G., and Gottlieb, D. 1966. Effect of suger on germination and metabolism of teliospore of *Ustilago maydis*. Phytopathology, 56: 479-484.

10. Christensen, J.J. 1963. Corn Smut Caused by *Ustilago maydis*. Monograph number 2. APS Press. 41 p.

11. Christensen, J.J. 1931. Studies on the genetics of *Ustilago zeae*. Phytopathology, 21: 129-188.

12. Day, P.W. 1974. Genetics of Host- Parasite Interaction. W.H. Freeman Company. San Farancisco. 238 p.

13. Day, P.R., and Anagnostakis, S.L. 1971. Meiotic products from natural infection of *Ustilago maydis*. Phytopathology, 61: 1020-1021.

14. Donaldson, M.E., and Saville, B.J. 2008. Bioinformatic identification of *Ustilago maydis* meiosis genes. Fungal Genetic and Biology, 45(3): 547-553.

15. Fischer, G.W., and Holton, C.S. 1957. Biology and Control of the Smut Fungi. Ronald. New York, 437 p.

16. Fuentes-Davila, G., and Duran, R. 1986. *Tilletia indica*: cytology and teliospore formation in vitro and in immature kernels. Canadian Journal of Botany, 64: 1712-1719.

17. Kahmann, R., and Kamper, J. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. Available at: WWW.newphytologist.org.

18. Kiernan, J.A. 1990. Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice. Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 450p. 2nd ed.

19. Piepenbring, M., Bauer, R., and Oberwinkler, F. 1998a. Teliospore of smut fungi: general aspects of teliospore walls and sporogenesis. Protoplasma, 204: 155-169.

20. Piepenbring, M., Bauer, R., and Oberwinkler, F. 1998b. Teliospore of smut fungi: teliospore walls and the development of ornamentation studied by electron microscopy. Protoplasma, 204: 170-201.

21. Perez-Martin, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J., and Carbo, N. 2006. Pathocycles : *Ustilago maydis* az a model to study the relationship between cell cycle and virulence in pathogenetic fungi. Molecular Genetic Genomics, 276: 211-229.

22. Puhalla, J.E. 1968. Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Genetics, 60: 461-474.

23. Ramberg, J.E., and Mclaughlin, D.J. 1980. Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in *Ustilago maydis*. Canadian Journal of Botany, 58: 1548-1561.

24. Sampson, K. 1939. Life cycle of smut fungi. Mycolologia, 13: 1-23.

25. Snetselaar, K.M. 1993. Microscopic observation of *Ustilago maydis* maiting intreraction. Experimental Mycology, 17: 345-355.

26. Snetselaar, K.M., and McCann, M.P. 1997. Using microdensitometry to correlate cell morphology with the nuclear cycle in *Ustilago maydis*. Mycologia, 89: 689-697.

27. Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. 1994. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis*: Infection hyphae and developing teliospores. Mycolgial Research, 98: 347-355.

28. Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. 1993. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. Phytopathology, 83: 843-850.

29. Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. 1992. Sporidial fusion and infection of maize seedling by the smut fungus *Ustilago maydis*. Mycologia, 84: 193-203.

30. Therrien, C.D., Royer, M.H., and Strauss, J.A. 1988. The ultrastructure and nuclear DNA content of *Tilletia indica.* Phytopathology, 78: 728- 732.