

**AISLAMIENTO Y REGENERACIÓN DE PROTOPLASTOS DE *Rhynchosporium secalis*
 CAUSANTE DE LA ESCALDADURA DE LA CEBADA**

por Alfredo D. Martínez-Espinoza¹ y
David C. Sands²

**ISOLATION AND REGENERATION OF *Rhynchosporium secalis* PROTOPLASTS THE
 CAUSAL AGENT OF BARLEY SCALD**

ABSTRACT

Protoplasts from conidia and mycelium were isolated from the fungus *Rhynchosporium secalis* by using Novozyme 234 at 10 mg/ml. The age of the culture was a determinant factor to obtain protoplasts from mycelium, but it did not have a significant effect in the case of conidia. Shaking during incubation of the fungus with the enzyme was important in the production of protoplasts from mycelium, while it was not important for protoplast isolation from conidia. Fluorescent microscopy revealed that the protoplasts were mainly uninucleated 90-100% when obtained from conidia, and 70-80% uninucleated when obtained from mycelium. The remaining protoplasts bore two nuclei. Ten percent of the total protoplasts were regenerated and gave rise to discrete colonies on the medium used.

KEY WORDS: Protoplasts, *Rhynchosporium secalis*, scald.

RESUMEN

Se aislaron protoplastos a partir de conidios y micelio del hongo *Rhynchosporium secalis* empleando Novozyme 234 a una concentración de 10 mg/ml. La edad del cultivo fue un factor determinante para la obtención de protoplastos aislados de micelio, sin embargo no tuvo un efecto significativo en el caso de los conidios. La agitación durante la incubación del hongo con la enzima fue importante en el caso del micelio, mientras que no influyó en la obtención de protoplastos a partir de conidios. Mediante microscopía fluorescente se encontró que los protoplastos fueron mayoritariamente uninucleados: 90-100% cuando provenían de conidios y de un 70-80% cuando eran obtenidos de micelio. Los protoplastos restantes mostraron dos núcleos. Se obtuvo una regeneración de protoplastos del 10% los cuales formaron colonias discretas en el medio utilizado.

PALABRAS CLAVE: Protoplastos, *Rhynchosporium secalis*, escaldadura.

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética. Apdo. Postal 629. Irapuato, Gto. 36500 México.

² Department of Plant Pathology, Montana State University, Bozeman Montana 59717-0314 USA.
Recibido: 17 de abril, 1995. Aceptado: 27 de septiembre, 1995.

Solicitud de sobretiros: Alfredo D. Martínez-Espinoza¹.

INTRODUCCIÓN

Rhynchosporium secalis (Oudem.) J. J. Davis, el agente causal de la escaldadura de la cebada (*Hordeum vulgare*), es un hongo filamentosos, clasificado dentro de los Deuteromycetes u hongos imperfectos, los cuales no tienen un ciclo sexual aparente (Barnett y Hunter, 1972). Se encuentra mundialmente distribuido, sobre todo en regiones húmedas y frescas (Shipton *et al.* 1974), sigue propiciado pérdidas económicas significativas (Shipton *et al.*, 1974; Mathre, 1982; Bjarko, 1990). Una de las características principales de este hongo es su variabilidad patogénica y aunque no se conoce su ciclo sexual, existe una gran variabilidad en cuanto a morfología, crecimiento colonial, pigmentación, esporulación y reacción patogénica (Shipton *et al.*, 1974; Jackson y Webster, 1976; Mc Dermott *et al.*, 1989).

Los protoplastos, células a las que se les ha eliminado la pared celular y que son capaces de llevar a cabo un metabolismo activo, han sido descritos como armas útiles en la investigación micológica en las últimas décadas. A la fecha se han aislado protoplastos de un número considerable de hongos pertenecientes a todos los grupos taxonómicos (Peberdy, 1979; Peberdy, 1980; Kitamoto *et al.*, 1988). Existe una variedad de aplicaciones para los protoplastos de hongos, entre los que se pueden citar la obtención de organelos (vacuolas, mitocondrias, núcleos, etc.), para el estudio de sistemas osmóticos y de permeabilidad, biogénesis de la pared celular, fusión celular, resistencia de las células a factores físicos etc. (Peberdy y Ferenczy, 1985). Su uso más reciente se ha concentrado en estudios genéticos, como la fusión interespecífica de protoplastos de diversos hongos (Peberdy, 1979; Peberdy, 1980; Layton y Kuhn, 1988), la obtención de mutantes en hongos filamentosos que no exhiben esporulación, el aislamiento de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Schulz *et al.*, 1990; Bolker *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 1985) y la transformación molecular (Ferrer *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1988; Bolker *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990).

El aislamiento de protoplastos en hongos filamentosos está influenciado por una serie de factores incluyendo edad del cultivo, el pH del medio, las enzimas utilizadas, la naturaleza del estabilizador osmótico, la temperatura de incubación, la forma del hongo (espora o micelio), etc. Con base en la información hasta hoy obtenida, no existe un sistema universal para la obtención de protoplastos, y que las condiciones óptimas deben ser determinadas para cada organismo.

Son pocos los estudios a nivel genético realizados con *R. secalis* (McDermott *et al.*, 1989) y es prácticamente nula la investigación a nivel molecular en este hongo. Para estudiar las bases genéticas y los mecanismos moleculares de la variabilidad en *R. secalis*, así como la capacidad de este patógeno para evadir la resistencia de las plantas, es necesario establecer primeramente un sistema para el aislamiento de mutantes.

Con el objetivo de aislar mutantes con una alta frecuencia y establecer un sistema de transformación molecular eficiente, aquí se describe una optimización en el aislamiento y regeneración de protoplastos del hongo fitopatógeno *Rhynchosporium secalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y medio de cultivo: La cepa de *R. secalis* utilizada durante todos los experimentos se denominó HF-88 y se aisló de hojas de cebada infectadas en forma natural en el campo

experimental de la Universidad Estatal de Montana en Bozeman, MT., EUA. Para el aislamiento inicial del hongo se utilizó agar-agua al 1.5 %, mientras que para el cultivo y su propagación se utilizó frijol lima-agar (Difco) y para la producción de micelio en medio líquido se utilizó extracto de levadura y malta (3 g/l extracto de levadura, 3 g/l extracto de malta, 5 g/l peptona, 10 g/l glucosa).

Obtención de conidios y micelio: Las lesiones visibles de escaldadura (Fig. 1) presentes en hojas de cebada se lavaron con agua corriente por 3-5 minutos y se desinfectaron durante 3 minutos con una mezcla de cloro comercial al 14 % y 10 % de etanol diluidos en agua. Posteriormente los tejidos se depositaron en cajas petri con agar-agua y se incubaron a 16 °C. Después de 6-7 días, del micelio de aspecto hialino, ramificado y compacto, característico de este hongo se aislaron fragmentos con una aguja estéril y se transfirieron a tubos de ensaye conteniendo frijol lima-agar y se incubaron a 16 °C, después de obtener crecimiento, éstos se utilizaron inmediatamente o se conservaron a 4 °C. De estos tubos de ensaye, se hicieron subcultivos en cajas petri con el mismo medio incubándose a 21 °C para luego preparar suspensiones de esporas raspando las colonias con un portaobjetos estéril y filtrando asepticamente a través de una malla de tela para remover el micelio e impurezas. El micelio de *R. secalis* se obtuvo en el medio líquido de extracto de levadura y malta. Matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio se inocularon con 1 ml de suspensión de conidios obtenidos mediante el raspado de cajas petri como se describió anteriormente, y se incubaron en constante agitación (agitador orbital a 150 rpm) por lo menos 6 días a 18-20 °C.

Aislamiento de protoplastos a partir de micelio: Varios procedimientos fueron evaluados con el fin de obtener un alto rendimiento de protoplastos viables. En experimentos preliminares se evaluaron 2 soluciones estabilizadoras, KCl 1M - Na₂PO₄ 0.001M y MgSO₄ 1M - Na₂PO₄ 0.01M. Se observó que no hubo diferencias significativas entre estas soluciones, por lo que se seleccionó el estabilizador osmótico con KCl, ya que se ha utilizado con más frecuencia en el aislamiento de protoplastos de otros hongos. Así mismo, se encontró que la temperatura de incubación del hongo con el complejo enzimático no tuvo ningún efecto hasta los 37 °C por lo que los experimentos posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Se evaluaron diferentes edades del cultivo y dos condiciones físicas (agitación vs estático). El micelio procedente de 100 ml de medio crecido por 6 días se centrifugó a 720 x g por 5 min, se resuspendió en KCl-Na₂PO₄ y se incubó con dos diferentes sistemas enzimáticos a) Novozyme 234, 10 mg/ml y b) Novozyme 234 10 mg/ml + celulasa de *Penicillium funiculosum* 5 mg/ml. Las mezclas organismo-enzima fueron incubadas a temperatura ambiente por 4 h. Los protoplastos fueron filtrados asepticamente a través de fibra de vidrio, se lavaron una vez con el estabilizador osmótico y se resuspendieron finalmente en 1 ml de la solución estabilizadora.

Protoplastos de conidios: Los conidios se obtuvieron como se describió anteriormente y se concentraron por centrifugación (5 min 720 x g). Estas se resuspendieron en el estabilizador osmótico de KCl. Se les añadió el sistema enzimático (Novozyme 234 10 mg/ml o Novozyme 234 10 mg/ml + celulasa 5 mg/ml). La mezcla conidios-enzima se incubó por 4 h. Los protoplastos se centrifugaron y se lavaron con el estabilizador osmótico y finalmente fueron resuspendidos en 1 ml del mismo.

Observación microscópica de protoplastos y determinación del número de núcleos: El número de protoplastos se determinó contando células circulares utilizando un hemocitómetro en

un microscopio compuesto. El número de núcleos presentes en los protoplastos se determinó fijándolos por 15 minutos en una solución de glutaraldehído al 5 % al cual se le agregó sorbitol 1M. Muestras de protoplastos se colocaron en portaobjetos a los cuales se les añadieron 10 μ l de una solución de DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol) a una concentración de 5 μ g/ml diluido en estabilizador osmótico. Las preparaciones se examinaron usando un microscopio de fluorescencia marca Zeiss.

Regeneración de protoplastos: Para determinar su capacidad de regeneración, los protoplastos se concentraron por centrifugación y se sembraron en cajas petri con frijol lima-agar sorbitol 1M (ya que los protoplastos son osmóticamente sensibles y el sorbitol es comunmente utilizado como estabilizador en medios sólidos), incubándose a 21 $^{\circ}$ C durante 7 días con un fotoperiodo de 12 h luz 12 h oscuridad. Las colonias resultantes se contaron como indice de la regeneración de los protoplastos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la técnica antes descrita fue posible obtener células esféricas con fragilidad osmótica (protoplastos), capaces de llevar a cabo un metabolismo activo y con capacidad de regeneración, a partir de micelio y conidios de *R. secalis* (Fig. 2). No hubo una diferencia significativa entre los sistemas enzimáticos evaluados en la obtención de protoplastos en ninguno de los estados de crecimiento del hongo (Tabla 1), por ello los experimentos subsiguientes se realizaron solamente con Novozyme 234. La temperatura de incubación entre 10-28 $^{\circ}$ C, de los conidios o micelio con la enzima, tampoco tuvieron un efecto notable en la producción de protoplastos. A una temperatura superior a 37 $^{\circ}$ C, no se lograron aislar protoplastos de ninguna de las dos formas del hongo, esto debido probablemente a que a esa temperatura el complejo enzimático es inactivo. En experimentos posteriores se utilizó temperatura ambiente para la obtención de protoplastos en forma rutinaria.

En general bajo las condiciones del estudio se obtuvieron protoplastos más eficientemente a partir de conidios que de micelio. La cantidad de protoplastos aislados se redujo cuando se incrementó la edad del cultivo, así el micelio proveniente de un cultivo de 6 días produjo un rendimiento de 2.92×10^6 , mientras que un cultivo de 10 días produjo 1.08×10^6 . Por el contrario, en conidios la edad del cultivo no tuvo un efecto drástico en el rendimiento de los protoplastos hasta un máximo de 16 días, (Tabla 2). En muchos otros sistemas la edad del cultivo es determinante en el rendimiento de protoplastos obtenidos (Peberdy y Ferenczy, 1985). Aunque en el caso de conidios de *R. secalis* no parece ser determinante la edad del cultivo, es recomendable aislar protoplastos a partir de conidios jóvenes, ya que ésto eliminaría problemas relacionados con otros efectos tales como excesiva vacuolización, baja capacidad de regeneración, etc.

La agitación durante la incubación de conidios con el complejo enzimático no tuvo un efecto significativo en el rendimiento de protoplastos, sin embargo al ser incubado con el micelio del hongo aumentó considerablemente el rendimiento de protoplastos (Tabla 3). Es posible que con agitación, la enzima tenga un mayor acceso a todas las partes del micelio, o posiblemente este factor físico ejerza una fuerza mecánica que ayude a una mejor disociación de los protoplastos.

La microscopía de fluorescencia reveló que la mayoría de los protoplastos contenían un solo núcleo (Fig. 3), con un porcentaje menor de protoplastos binucleados. No se detectaron protoplastos que tuvieran más de dos núcleos. Un 95-100 % de protoplastos provenientes de los conidios eran uninucleados, mientras que de micelio fue de un 70-80 %. El resto eran binucleados (Fig. 3). En un organismo haploide, es de vital importancia que los protoplastos contengan un solo núcleo, ya que procesos como la selección de mutantes y la transformación molecular serían mucho más eficientes.

Se lograron regenerar los protoplastos utilizando el medio frijol lima-agar al que se le adicionó sorbitol 1M. El porcentaje de regeneración fue de 6-14 % en el caso de protoplastos de micelio y de 7-13 % en el de conidios. El porcentaje de regeneración en otros sistemas varía del 1% al 50 % en hongos filamentosos y hasta un 80-100% en hongos levaduriformes (Peberdy, 1979; Picataggio *et al.*, 1983; Stasz *et al.*, 1988).

La optimización del rendimiento de protoplastos es de vital importancia para la realización de diversos estudios a nivel genético entre los que se pueden citar el uso de protoplastos para la selección de mutantes. Recientemente, el uso de protoplastos se ha generalizado para la obtención de ADN de mejor calidad que aquel obtenido cuando se rompen las células por otros métodos más violentos, como la pulverización del micelio con nitrógeno líquido o mediante sonicación; ya que estos métodos producen el rompimiento del ADN.

Los protoplastos obtenidos tuvieron mayoritariamente un núcleo, hecho que presenta una ventaja adicional para el proceso de mutagénesis y selección de mutantes y de subsecuentes estudios a nivel molecular. El aislamiento de protoplastos de diversos estadios del hongo también resulta beneficioso. Por ejemplo se pueden crecer lotes más grandes de cultivo y aislarlos del estado de micelio cuando el uso final sea la obtención de ADN, ya que el número de núcleos por protoplastos es irrelevante. Por el contrario cuando se requieran protoplastos uninucleados para realizar mutagénesis o transformación, éstos se pueden aislar de los conidios. Nuestros resultados pueden ser utilizados como base para estudios a nivel genético o mutacional y son la base para el desarrollo de un sistema de transformación molecular en este hongo.

LITERATURA CITADA

- Barnett, H. L., B. Hunter, 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd ed., Burgess Publishing Company. Minneapolis
- Bolker, M., M. Urban, R. Kahmann, 1992. The *a* mating-type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signalling components. *Cell* 68: 441-450.
- Bjarko, M. E., 1990. *Montana-USAID activities in developing barley germoplasm*. Proceedings of a symposium Biotic Stress of Barley. Big Sky Montana.
- Ferrer, S., D. Raman, J. Salom, E. Vincent, F. Urubury, 1985. Protoplasts from *Pedospora anserina*: Isolation, purification and transformation. *Curr. Microbiol.* 12:301-306.
- Jackson, L. F., R. K. Webster, 1976. Race differentiation, distribution and frequency of *Rhynchosporium secalis* in California. *Phytopathology* 66: 719-735.
- Keller, U., 1983. Highly efficient mutagenesis of *Claviceps purpurea* by using protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 580-584.
- Layton, A. C., D. N. Khun, 1988. The virulence of interracial heterokarions of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology* 78: 961-966.

- Kitamoto, Y. N., Mori, M., Yamamoto, T., Ohiwa, Y., Ichikawa, 1988. A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi, using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 445-450.
- Mathre, D. E., 1982. *Compendium of barley diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul.
- McDermott, J. M., B.A. McDonald, R. W. Allard, R. K. Webster, 1989. Genetic variability for pathogenicity by isozyme, ribosomal DNA and colony color in populations of *Rhynchosporium secalis*. *Genetics* 122:561-565.
- Peberdy, J. F., 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-39.
- Peberdy, J. F., 1980. Protoplast fusion: a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganism. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 24-29.
- Peberdy, J. F., L. Ferenczy, 1985. *Fungal protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics*. Meral Dekker, New York.
- Picataggio, S.K., D. H. J. Schamhart, B. S. Montencourt, D. E. Eveleigh, 1983. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:121-128
- Schulz, B., F. Banuett, M. Dahl, R. Schlesinger, W. Shafer, T. Martin, I. Herskowitz, R. Kahmann, 1990. The b alleles of *U. maydis* whose combinations program pathogenic development, code for polipeptides containing a homeodomain related motif. *Cell* 60: 295-306.
- Shipton, W. A., W. J. R. Boyd, S. M. Ali, 1974. Scald of barley. *Rev. Plant Pathol.* 53: 839-861.
- Stasz, T. E., G. E. Harman, N. F. Weeden, 1988. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 80: 141-150.
- Wang, J., D. W. Holden, S. Leong, 1988. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87: 1470-1474.

Tabla 1. Protoplastos obtenidos con diferentes sistemas enzimáticos.

Sistema enzimático	Número de protoplastos (media)
Conidio ¹	
Novozyme ²	1.98 x 10 ⁶
Novozyme + Celulasa 5 mg/ml	1.80 x 10 ⁶
Micelio ³	
Novozyme	1.74 x 10 ⁶
Novozyme + celulasa	1.97 x 10 ⁶

¹ Concentración de esporas 2.0 x 10⁷² A una concentración de 10 mg/ml³ 100 ml de cultivo crecido por 6 días

Tabla 2. Efecto de la edad del cultivo en el rendimiento de protoplastos.

Forma	Edad de cultivo (días)	Media del # de protoplastos
Micelio ¹	6	2.92 x 10 ⁶
Micelio	10	1.08 x 10 ⁶
Conidio ²	8	2.84 x 10 ⁶
Conidio	16	2.82 x 10 ⁶

¹ Concentración de conidios 2.93 x 10⁶² 100 ml de cultivo crecidos a los días indicados

Tabla 3. Efecto de los factores físicos durante el periodo de incubación con la enzima, en el rendimiento de protoplastos.

Forma	Agitación 100 rpm	Número de protoplastos (media)
Micelio ¹	Agitación	3.20 x 10 ⁵
Micelio	Estático	1.29 x 10 ⁴
Conidio ²	Agitación	2.09 x 10 ⁶
Conidio	Estático	1.84 x 10 ⁶

¹ 100 ml de cultivo crecido por 6 días² Concentración de conidios 2 x 10⁶



Fig. 1. Síntomas de Escaldadura en cebada producidas por *Rhynchosporium secalis*

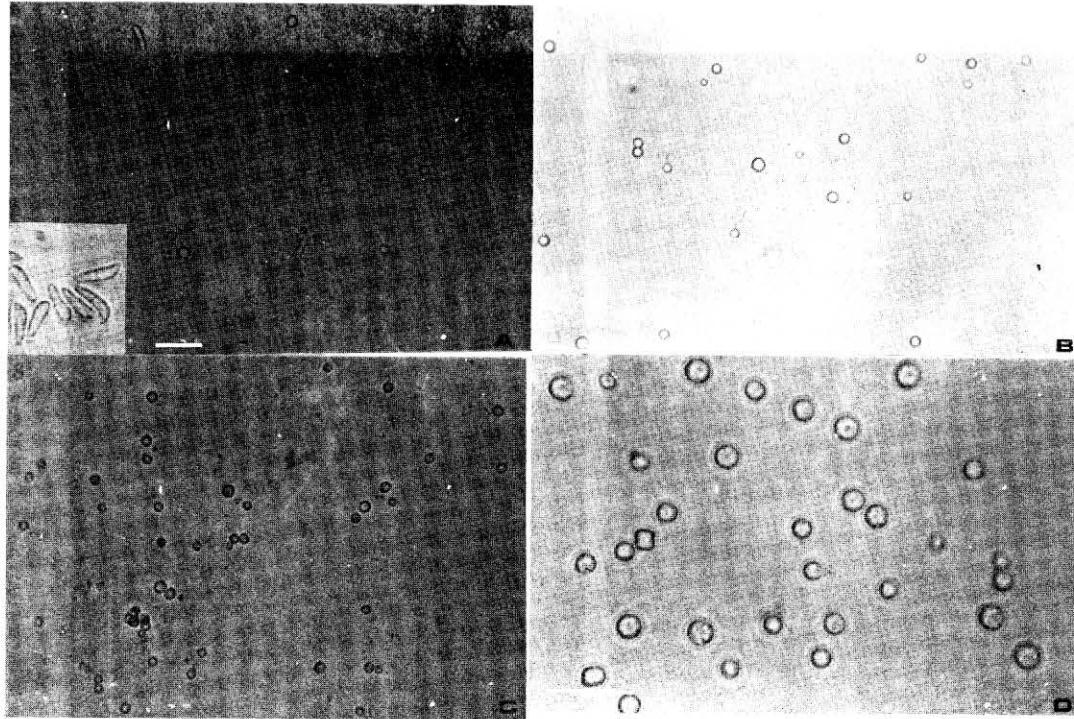


Fig. 2. Protoplastos aislados de *Rhynchosporium secalis*. a) Protoplastos aislados de conidios, mostrando algunos conidios todavía intactos. En el recuadro, conidios silvestres como comparación. b) Protoplastos de conidios en fases más avanzadas de aislamiento con células totalmente digeridas. c) Protoplastos de micelio. Barra en a, b y c = 10 μm . d) Acercamiento de protoplastos de conidios donde se pueden observar diferentes tamaños, pared celular digerida e integridad osmótica. Barra = 10 μm .

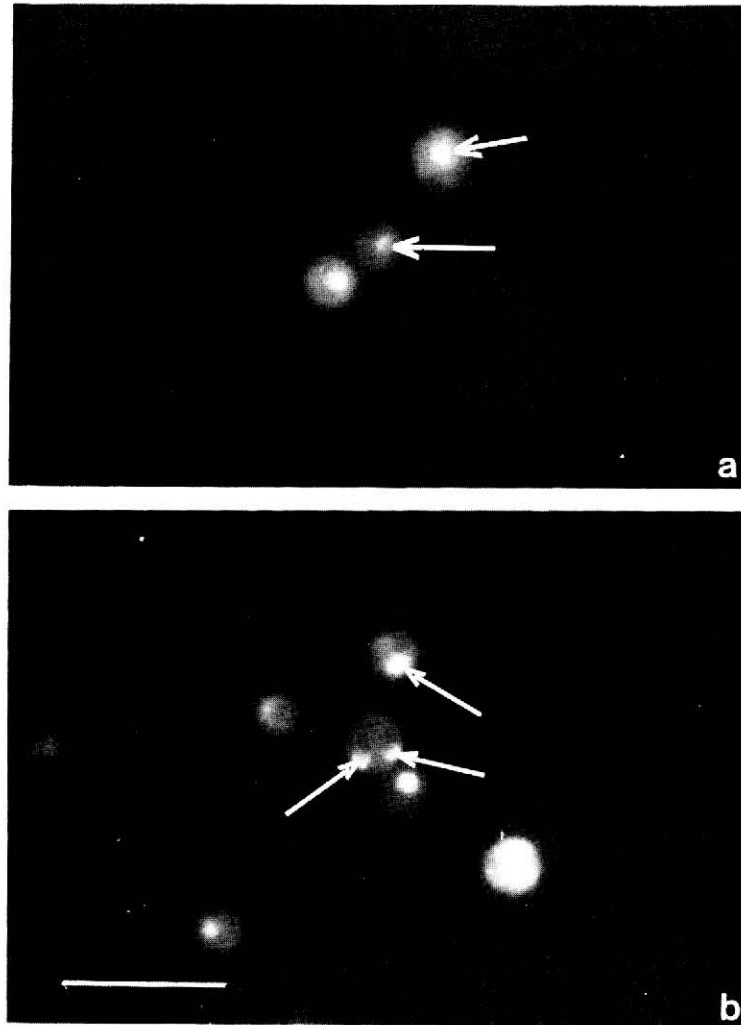


Fig. 3. Protoplastos teñidos con DAPI mostrando los núcleos. a) Protoplastos derivados de conidios mostrando un solo núcleo (flecha). b) Protoplastos derivados de micelio mostrando uno o dos núcleos (flecha). Barra = 10 μ m.