

ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL Y FITOPATOLOGÍA

# PRODUCCIÓN DE ESFEROPLASTOS A PARTIR DE ESPORANGIOS DEL MILDEO VELLOSO (*Peronospora sparsa* Berkeley) DE LA ROSA COMERCIAL

SPHEROPLASTS PRODUCTION USING SPORANGIA OF DOWNY MILDEW (*Peronospora sparsa* Berkeley), PARASITE OF THE COMMERCIAL ROSE

Angélica Aguilera Gómez B.Sc<sup>1</sup>

Juan José Filgueira Duarte Ph.D<sup>1,2</sup>

Foto Flickr

Recibido 13 de septiembre de 2009

Aceptado 12 de octubre de 2009

1. Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias, Biología Aplicada, Grupo de Fitopatología Molecular.  
2. Autor para correspondencia: [juan.filgueira@unimilitar.edu.co](mailto:juan.filgueira@unimilitar.edu.co)

## RESUMEN

Para el presente estudio, se estandarizó una técnica para el cultivo bajo condiciones de laboratorio del parasito biotrofo (*Peronospora sparsa* Berkeley), en cámara húmeda; también realizo cultivo *in vitro* de la variedad de rosa Charlotte, con el fin de realizar los ensayos de infección sobre este material vegetal; se evaluaron mezclas enzimáticas y concentraciones de estas, para realizar la digestión de la pared celular de los esporangios de mildew velloso y se encontró que al cabo de 5 horas se obtenían esferoplastos con la mezcla enzimática de Fluka (enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*), 2 mg/ml y Driselasa 3 mg/ml, también se evaluaron diferentes buffers hasta conseguir aquel que garantizara el equilibrio osmótico de los esferoplastos durante su producción y manipulación en los ensayos de infección. Se encontró que el buffer KC (KCl 0.64M, CaCl<sub>2</sub> 0.2 M) mantuvo los esferoplastos osmóticamente estables durante un periodo de hasta 24 horas. Luego de 3 lavados y re-suspensión en buffer MTC-10 (1M manitol, 10mM tris, pH 7.5), con los esferoplastos obtenidos se realizó un seguimiento del proceso infectivo tanto en plántulas producidas *in vitro*, como sobre foliolos de campo de rosa variedad Charlotte, utilizando técnicas de microscopia óptica y se observó que los esferoplastos además de conservar su capacidad infectiva, esta parecía ser más agresiva que la observada típicamente en la infección con esporangios, por lo tanto, se realizaron pruebas comparativas infectando al mismo tiempo, los mismos tipos de tejidos tanto con esferoplastos como con esporangios y se pudo

llegar a la conclusión que el desarrollo de la enfermedad del mildew velloso de la rosa, es más rápido y expansivo en la infección con esferoplastos que con esporangios normales. Por último, se realizo un seguimiento del proceso infectivo en plantas completas de la variedad de rosa Charlotte y se observo la aparición de síntomas típicos de la enfermedad en la mitad del tiempo que normalmente se observa en plantas infectadas con mildew velloso en campo.

**Palabras clave:** Mildew velloso, esferoplastos, esporangios, rosa.

## SUMMARY

For this study, it was standardized a technique to cultivated under laboratory conditions the biotrophic parasite *Peronospora sparsa* Berkeley. An *in vitro* growing media for rose Charlotte varietyh was also standardized. Infection assays were made on this vegetable material, evaluating enzymatic mixtures and concentrations, in order to digest the cellular wall of downy mildew sporangia: It was found that after 5 hours the spheroplasts were obtained with the enzymatic mixture Fluka (litic enzymes of *Trichoderma harzianum*) 2mg/ml and Driselase 3 mg/ml. Buffers were also evaluated with the purpose to find one of them that could guarantee the osmotic equilibrium of these spheroplasts during their production and manipulation: It was found that the buffer KC (KCl 0.64M, CaCl<sub>2</sub> 0.2 M), has the capability to maintain the spheroplast of *P. sparsa* under osmotic equilibrium during a period of 24 hours. After a re-suspension in buffer MTC-10 (1M Manitol, 10mM Tris, pH 7.5), with

these spheroplasts it was done an optic microscope follow up of the infective process on both plants that were produced *in vitro* and rose leaves that were recollected in field. In addition to keep their infective capabilities, spheroplasts also look more aggressive than the infective capability observed typically in infection with sporangia, as a consequence, there were made comparative proofs infecting at the same time, the same type of tissues not only with spheroplasts but also with sporangia and it was concluded that the development of the disease downy mildew is more faster and expansive in the infection caused by spheroplasts than the infection caused by sporangia. Finally a follow up of the infection was made in complete plants of Charlotte variety that were recollected in field, and it was observed that the appearance of typical symptoms of the disease were manifested at the half of time that it appear normally on infected plants in field.

**Keywords:** Downy mildew, Spheroplast, sporangia, rose.

## INTRODUCCIÓN

La floricultura en Colombia, es una de las actividades económicas que mas divisas le genera al país; Colombia es el segundo exportador mundial de flores después de Holanda, con una participación del 14% en el comercio total (Asocolflores, 2007). La enfermedad conocida como mildew veloso de la rosa, es causada por *Peronospora sparsa* Berkeley, esta enfermedad causa grandes pérdidas en los cultivos de flores (Gómez y Arbeláez, 2005). Desafortunadamente parece que todos los esfuerzos

por acabar con esta enfermedad han sido insuficientes, ya que se ha podido observar que cada año esta afección es más agresiva y que las estrategias químicas, físicas y agro culturales que antes funcionaban, han perdido eficacia y no resuelven las enormes pérdidas debidas a este problema sanitario (Arbeláez, 1999). *P. sparsa* es un parasito biotrofo fisiológicamente obligado que causa manchas irregulares en diferentes partes de la planta y que exhibe sobre el envés de las hojas una vellosidad gris debida a la proliferación y fructificación del micelio sobre la superficie del tejido necrosado (Spencer, 1981). En 1994 *P. sparsa* se reubico fuera del reino de los hongos, ya que en su pared celular en lugar de tener quitina como la mayoría de hongos verdaderos contiene celulosa (Carlile, 1994; Margullis, 1998). A pesar del escaso conocimiento que se tiene en la actualidad de la biología del patógeno, se ha observado que este se ha adaptado a las condiciones de cultivo en Colombia. Hasta el momento este hongo no ha sido descrito como sistémico, por lo que con este trabajo se intenta principalmente, dar un paso en el desarrollo de metodologías que nos permitan llegar a concluir acerca de este comportamiento sistémico; en algunos reportes se afirma que el cambium vascular y las regiones externas del floema aparecen como los sitios iniciales de la infección de el patógeno causante del mildew veloso (familia peronosporaceae), en otras especies vegetales, una vez el patógeno ha entrado al tallo, crece intercelularmente y se disemina a través del cambium, floema externo y xilema, ocasionando una necrosis severa y en muchos casos distorsión de tejidos o hiperplasias (Sargent, 1981). Otros autores han observado hifas intracelulares en vasos del

xilema y las células del parénquima en plantas inmaduras de tabaco (Schiltz, 1981). Por esto se ha establecido la teoría de la posible sistemicidad del mildew velloso de la rosa. Esta posible sistemicidad hace que la enfermedad sea difícil de controlar, especialmente con fungicidas de contacto comunes (Flórez, 1996). La importancia de la obtención de los esferoplastos, radica en que estos son una herramienta para la intención de transformar genéticamente el parásito con genes reporteros y con esto realizar un seguimiento interno; con esto se generara un gran impacto ya que se podrían re-evaluar los tratamientos tanto químicos como culturales hasta el momento usados, buscando mayor efectividad, menos perdidas a nivel económico y a la vez, hacer una aporte importante al conocimiento de la biología de *P. Sparsa*.

La transformación genética de otros oomycetes pertenecientes principalmente a los géneros *Phytophthora* y *Pythium* se ha llevado a cabo por medio de técnicas como bombardeo de microproyectiles o biobalística (Cvitanich y Judelson, 2003b), electroporación y mediante la transferencia de DNA foráneo con la ayuda de *Agrobacterium tumefaciens* (Vijn y Govers, 2003). Teniendo en cuenta las dificultades para trabajar con microorganismos biotrofos, el primer y único caso reportado de transformación obtenida para un oomycete de este tipo se logro mediante el método "Löchern" para *Plasmopara halstedii*, todos los esfuerzos previos utilizando este y otros patógenos obligados no fueron exitosos (Hammer, et al., 2007).

Teniendo en cuenta el objetivo de transformación genética, la producción de protoplastos y esferoplastos se ha presentado como una

técnica útil que permite sobrepasar el obstáculo de la pared celular (Lamour, et. al., 2007).

El primer trabajo realizado y reportado para la transformación de un oomycete se realizó empleando esferoplastos de *P. infestans*, producidos en un proceso que implicaba el uso de Novozyrna 234 (Judelson et al., 1991), sin embargo, en la actualidad esta metodología no es replicable pues la enzima fue descontinuada comercialmente. Aquí se propone una metodología para superar este inconveniente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización de los ensayos

El inóculo de mildew velloso de la rosa se obtuvo de plantas ubicadas a campo abierto en la sede de Cajica de la Universidad Militar Nueva Granada. Los folíolos, yemas, y plantas completas para la realización de los ensayos, se obtuvieron de un invernadero contenido ubicado también en la sede de Cajica de la Universidad Militar Nueva Granada. El mantenimiento del cultivo de mildew velloso, la introducción de yemas para la producción de microplantulas *in vitro*, la obtención de los esferoplastos, las infecciones del material vegetal y el seguimiento microscópico se realizaron en los laboratorios de biotecnología, fitopatología y cultivo de tejidos de la Universidad Militar Nueva Granada. Todo el material vegetal utilizado fue rosa de la variedad comercial Charlotte.

### Recolección del material afectado por *P. sparsa*

Se recolectaron folíolos con síntomas típicos de la enfermedad, como manchas de color pardo rojizo, manchas cloróticas etc. estos

fueron colocados en cámara húmeda por 24 horas, esta cámara consistió en una caja plástica de 30x20x15 cm que contenía al fondo algodón mojado, sobre este algodón mojado a 3 cm se colocó una malla plástica sobre la cual reposaban los foliolos, la abertura de la caja fue completamente sellada con papel cristal.

#### Recolección y lavado de material sano

Se recolectaron hojas tiernas y sanas del tercio superior de la planta, estos foliolos fueron sometidos a tres lavados en un beaker de 1000 ml estéril como se describe a continuación: **a.** Agua destilada estéril 500ml + Hipoclorito de Sodio al 50% 200ml, durante 1 min. **b.** Re-suspensión del material en 500ml de agua destilada estéril + tween 80 al 0.1% durante 6 min. **c.** Agua destilada estéril tres veces seguidas hasta retirar todo el detergente. Estos foliolos se secaban con el envés hacia arriba con ayuda de toallas absorbentes estériles.

#### Obtención del inoculo empleado para el cultivo

La suspensión de esporangios se obtuvo barriendo las lesiones esporuladas con un pincel estéril en agua destilada estéril, luego la suspensión era filtrada en un beaker estéril con ayuda de velo suizo estéril, posteriormente se realizó la cuantificación de los esporangios por ml con ayuda de un hemocitometro y bajo un microscopio con el objetivo 10x.

#### Cultivo de *P. sparsa* bajo condiciones de laboratorio

Se condicionaron cajas de Petri cuyo fondo era cubierto con toalla absorbente humedecida con 3ml de agua destilada estéril,

sobre esta se colocaban los foliolos a infectar con el envés hacia arriba, estos foliolos eran infectados por medio de la técnica de gota suspendida con la suspensión de esporangios (Gómez, 2004), finalmente las cajas se tapaban y se dejaban bajo condiciones de salón durante 24 horas al cabo de las cuales, los foliolos eran secados completamente con toallas estériles y se dejaban nuevamente bajo condiciones de salón (Figura 1).

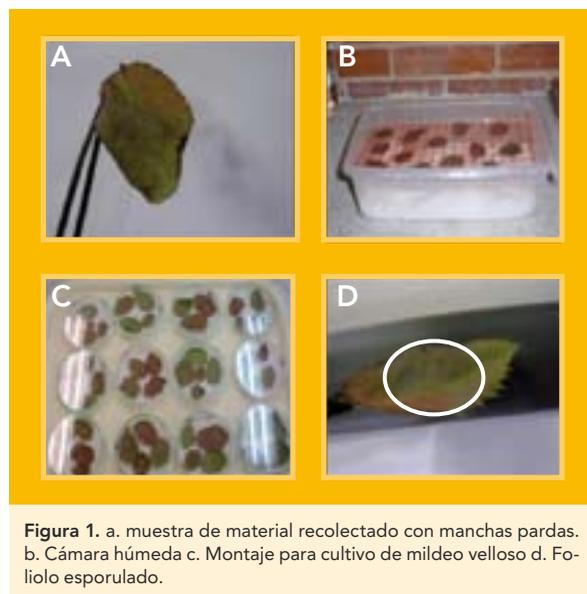


Figura 1. a. muestra de material recolectado con manchas pardas. b. Cámara húmeda c. Montaje para cultivo de mildew veloso d. Foliolo esporulado.

#### Producción de microplántulas de rosa variedad Charlotte

Se introdujeron yemas de la variedad en medios de cultivo *in vitro*, Las condiciones de cultivo fueron entre 18 y 26 °C, 12 horas de fotoperiodo y luz halógena de 6000 lux. Luego de establecer el medio de cultivo adecuado (evaluando N<sub>o</sub> de plántulas introducidas vs N<sub>o</sub> de plántulas que sobreviven), se introdujeron 150 yemas semanales durante 11 meses consecutivos.

### **Velocidad y tiempo de centrifugación de los esporangios de *P. sparsa*.**

Se tomó la suspensión de esporangios a una concentración de  $3 \times 10^4$  esporangios/ml, con la cual se llenaron 4 tubos Eppendorf de 2ml, luego de centrifugar a diferentes velocidades y tiempo, se realizaron observaciones del contenido de esporangios tanto del sobrenadante como del pellet en el microscopio de luz bajo objetivo de 10x.

### **Ensayos para la obtención de esferoplastos de *P. sparsa*.**

Para los diferentes ensayos se utilizaron las siguientes enzimas de digestión de la pared celular: Celulasa Onozuka R-10, Driselasa de *Basidiomycetes*, Macerozima R-10, enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Fluka); para la preparación de los buffers se utilizó b-Manitol SIGMA® y D- Sorbitol SIGMA®.

### **Preparación de las enzimas de digestión**

En tubos Falcón de 15 ml estériles y con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril, se colocaron 6ml del buffer KC (estéril y a temperatura ambiente); la cantidad de enzima requerida fue pesada y posteriormente adicionada al tubo Falcón que contenía los 6ml del buffer KC, esta solución era colocada en el vortex durante 5 minutos al cabo de los cuales el contenido del tubo Falcón era depositado directamente en cajas de Petri pequeñas estériles; en los tres últimos ensayos de obtención de esferoplastos fue necesario filtrar la solución con ayuda de un filtro de  $2\mu$ .

### **Preparación de los esporangios para la digestión de su pared celular**

Con ayuda de una pipeta Pasteur se depositaron 2ml de la suspensión de esporangios

( $3 \times 10^4$  esporangios/ml), en un tubo Eppendorf de 2.5 ml, esta suspensión fue centrifugada a 6000 rpm x 3min, posteriormente con una pipeta Pasteur se retiró el sobrenadante cuidadosamente y con el fin de evitar que los esporangios quedaran formando grumos se colocó el pellet en el vortex durante 30 segundos, finalmente este pellet era depositado directamente en una caja de Petri pequeña que contenía la solución de enzimas.

### **Seguimiento de la digestión de la pared celular de los esporangios de *P. sparsa*.**

Se realizó un seguimiento de la digestión de cinco horas con ayuda de un microscopio de luz Axioskap 2 plus- Zeiss bajo el objetivo de 40x, para realizar este seguimiento se tomó de forma muy suave con una pipeta de vidrio pequeña una muestra del fondo de la caja, cada media hora y se colocó cuidadosamente sobre una lamina, luego se observaba la disminución en el grosor de la pared, la estabilidad osmótica de la célula, y en general los cambios que se iban dando en el aspecto inicial de los esporangios.

### **Velocidad y tiempo de centrifugación de los esferoplastos de *P. sparsa***

Se introdujeron 6ml de suspensión de esferoplastos en tubos Falcón de 15 ml, y se realizaron pruebas de centrifugación a diferentes velocidades y tiempos como se describe a continuación: **a.** 500 rpm durante 5 minutos **b.** 500 rpm x 10 minutos **c.** 800 rpm x 5 minutos **d.** 800 rpm x 10 minutos **e.** 1200 rpm x 5 minutos **f.** 1200 rpm x 10 minutos **g.** 1280 rpm x 10 minutos, después de cada centrifugación tanto el pellet, como el sobrenadante

eran observados en el microscopio de luz bajo el objetivo 40x.

### **Lavado de esferoplastos**

como la suspensión de esferoplastos se encontraba en una caja de Petri pequeña, esta era colocada en un posición inclinada durante 10 minutos con el fin de decantar los esferoplastos, posteriormente con ayuda de una pipeta de vidrio, la suspensión era retirada muy cuidadosamente de la caja y se suspendía en un tubo Falcón de 15 ml estéril, luego esta era centrifugada a 21 °C, 1280 rpm durante 10 min, luego el sobrenadante del tubo era retirado desde los bordes muy cuidadosamente con una pipeta de vidrio estéril y se desechaba, el pellet del tubo era re-suspendido en 6ml de buffer KC y se centrifugaba bajo las mismas condiciones, este procedimiento se repetía tres veces seguidas. Por último el pellet se re-suspendía en 6 ml del buffer MTC-10 (manitol 1M, tris 10 mM, pH 7.5).

### **Infección de tejidos**

#### ***Infección de micro plántulas***

Se tomaron micro plántulas que ya se encontraban plenamente desarrolladas, se les retiro la tapa y bajo cada foliolo se colocó un pedazo pequeño de papel absorbente estéril, se realizaron lavados de las hojas durante 3 min con la suspensión de esferoplastos, posteriormente los frascos eran tapados de nuevo y se dejaban bajo condiciones de salón. También se realizo una infección con esferoplastos en foliolos de micro plántulas por el método de gota suspendida. Al cabo de 12 horas se realizaron cortes longitudinales del tejido y se observaron, con ayuda de un microscopio de luz y tinción con azul de lactofenol.

### ***Infección de foliolos sanos de campo***

Los foliolos fueron previamente lavados y dispuestos en cajas de Petri, se realizo la infección con esferoplastos por medio de la técnica de gota suspendida y se hicieron observaciones que consistieron en realizar cortes y teñirlos con azul de lactofenol 24, 48 y 72 horas después y observar con ayuda del microscopio óptico y tinción con azul de lactofenol.

### ***Infección de plantas completas***

se realizó una infección de plantas completas sanas con esferoplastos; estas plantas se encontraban en matera, tenían una altura de 50 cm y no tenían flores, para la infección se adecuó una cámara húmeda que diera cabida a una planta mediana, esta cámara estaba recubierta con velo suizo que a su vez estaba recubierto con papel cristal, el fondo de la cámara estaba tapizado por algodón mojado, antes de introducir la planta dentro de la cámara todos sus foliolos fueron lavados con una solución de Tween 80 al 0.1%, una vez ubicada la planta en el centro de la cámara se realizó la infección con los esferoplastos (12 ml de suspensión); para esto se tomó foliolo por foliolo y se hizo un lavado repetido muy suave durante 5 minutos en cada hoja con el fin de que todos los foliolos se encontraran totalmente impregnados de la suspensión de esferoplastos, finalmente la cámara fue sellada y se comenzaron a realizar observaciones de aparición de síntomas externos.

### **Capacidad de infección de esferoplastos vs esporangios.**

Se realizaron infecciones simultáneas de foliolos de microplántulas y foliolos de campo con esferoplastos y esporangios; con el

fin de establecer las diferencias en el tiempo de aparición de síntomas y el desarrollo de la enfermedad.

## RESULTADOS

### Obtención del inoculo

Los folíolos que fueron colocados directamente sobre el algodón mojado en la cámara húmeda presentaban exudados y la proliferación de microorganismos diferentes a *P. sparsa*, para evitar estos exudados se colocaron los folíolos sobre una malla plástica y aunque el periodo de esporulación fue un 25% más largo que en la cámara húmeda sin malla, la suspensión de esporangios obtenida fue más limpia y concentrada ( $3 \times 10^7$  esporangios/ml).

### Cultivo de *P. sparsa* bajo condiciones de laboratorio

Para la obtención y mantenimiento del cultivo de *P. sparsa* bajo condiciones de laboratorio, se observó que en el cultivo por medio de la técnica de gota suspendida, es necesario secar completamente los folíolos por el envés al cabo de 24 horas ya que de esta forma se evitan exudados, y hay una mayor limpieza y concentración de la suspensión de esporangios ( $3 \times 10^7$  esporangios/ml).

### Producción de microplantulas de rosa Variedad Charlotte

La cantidad de plántulas obtenidas con el medio de introducción y multiplicación de nudos de rosa sales basales Murashige y skoog suplementado (ver tabla 1), fue alta con relación al número de yemas introducidas, las

REACTIVO	mg/litro	CONCENTRACION
Medio Murashige and Skoog	4400	
6 Benzilaminaopurina	2.0	8,88 $\mu$ M
Acido indobutirico	0.4	1,11 $\mu$ M
Acido Cítrico	50	260 $\mu$ M
Acido Ascórbico	50	284 $\mu$ M
Azúcar	3000	
Phytigel	7000	
pH 5.8		

Tabla 1. Medio de introducción y multiplicación de nudos de rosa. Contiene sales basales de Murashige y Skoog, suplementado.

micro plántulas fueron obtenidas al cabo de cuatro semanas de realizar la introducción y tenían una supervivencia de 6 a 8 (Figura 2).

### Velocidad y tiempo de centrifugación de los esporangios de *P. sparsa*

La velocidad y tiempo de centrifugación que concentro en el pellet la totalidad de los esporangios que se centrifugaron en el tubo Eppendorf, fue 6000 rpm x 3 min, por lo tanto esta fue la velocidad y el tiempo que se continuo utilizando en el desarrollo de los posteriores ensayos de obtención de esferoplastos.

### Obtención de esferoplastos

Al cabo de 5 horas utilizando Enzimas líticas de *T. harzianum* (Fluka) 2mg/ml, Driselasa 3mg/ml, disueltas en buffer KC: KCl 0.64M, CaCl<sub>2</sub> 0.2M, fueron obtenidos los esferoplastos de *P. sparsa* los cuales se mantuvieron osmóticamente estables hasta por 24 horas, durante la preparación esta solución tuvo que ser filtrada con ayuda de un filtro de 0.2 $\mu$ , ya que cuando se adicionaba la Driselasa al buffer KC, se formaban unas estructuras en

forma de plato que debían ser eliminadas de la solución pues impedían visualizar los esporangios (Figura 3).

### Velocidad y tiempo de centrifugación de los esferoplastos

Para centrifugar los esferoplastos fue necesario hacerlo en un ciclo de inicio y frenado suave, pues de lo contrario es inevitable la lisis de estos, la velocidad y tiempo de centrifugación para obtener los esferoplastos en el pellet sin producir daño es de 1280 rpm durante 10 min. (Figura 4).



**Figura 2.** a. Microplantula de 4 semanas, obtenida con el medio Murashige y Skoog suplementado b. diferencias de desarrollo en las plántulas introducidas al mismo tiempo, izquierda orificio cubierto con papel cristal, en el medio orificio cubierto con tapa sin papel cristal, derecha, orificio cubierto con tapa y papel cristal.



**Figura 3.** a. esferoplastos obtenidos a partir de esporangios de *P. sparsa* (40X) b. estructuras en forma de plato que se observan al disolver driselasa en buffer KC (40 X, DIC).

### Infección de tejidos sanos de rosa con esferoplastos de *P. sparsa*

#### *Infección de microplantulas*

Se observó la presencia y desarrollo de la enfermedad cuando se realizó la infección de las microplantulas de rosa variedad Charlotte, lo que demostró que los esferoplastos conservan su capacidad infectiva (Figura 5).

#### *Infección de folíolos de campo*

En la infección de folíolos recolectados en campo con los esferoplastos se observó que los síntomas de la enfermedad eran más severos y el desarrollo de la enfermedad dentro del tejido era aparentemente más rápido que lo observado en estudios anteriores en la infección con esporangios (Figura 6).

### Esferoplastos vs esporangios

#### *Infección de microplantulas*

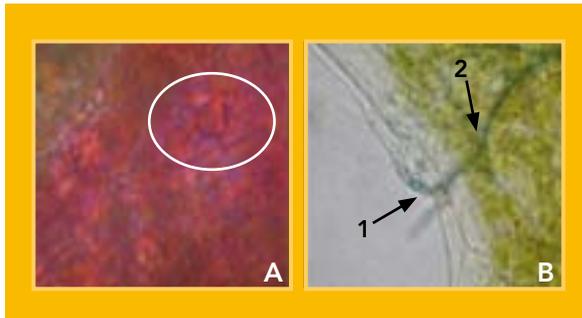
Se realizó una prueba comparativa de la infección producida por los esporangios vs. esferoplastos de *P. sparsa* ambos montajes bajo las mismas condiciones de laboratorio, y se observó una colonización más rápida y agresiva del patógeno en la infección con esferoplastos, ya que se observan estructuras redondeadas gigantes reportadas por Gómez, 2004, como estructuras recurrentes cuando la infección por el patógeno es severa (Figura 7 y 8).

#### *Infección de folíolos de plantas de campo*

Se observó que la enfermedad al interior de los tejidos infectados con esferoplastos avanza de forma



**Figura 4.** a. Restos de pared celular y citoplasma de los esferoplastos después de centrifugarlos en el ciclo normal (40X). b. esferoplastos después de centrifugar 1280 rpm, 10 min, ciclo de frenado y arranque suave (40X).



**Figura 5.** a. esferoplasto sobre el tejido de un foliolo de micro-plantula pocos minutos después de realizar la infección (100X) b. 1 haustorio, 2 hifas penetrando el tejido. Tinción con azul de lactofenol, (100x)

más rápida y severa, que en los foliolos infectados con esporangios, cuando el tejido de los foliolos se encuentra invadido por la infección, el patógeno cesa su desarrollo y se produce la muerte de las células del hospedero, de la misma forma como sucedió con los tejidos infectados de microplántulas.

#### **Infeción de plantas completas**

En este caso no se realizaron cortes longitudinales en las hojas sino que se observaron los síntomas directamente, estos se presentaron 24 horas después con manchas pardas y

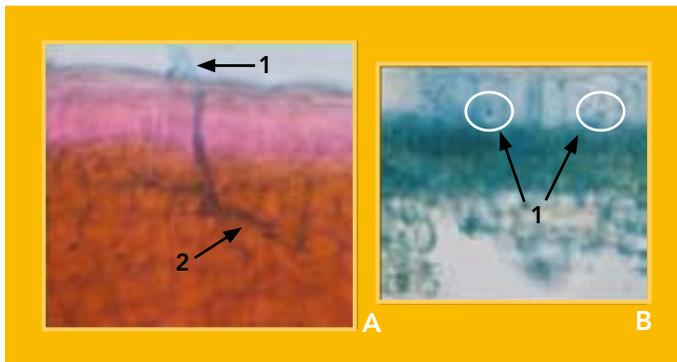
cloróticas, y al cabo de 48 horas algunas esporulaciones, contrario a lo sucedido en las infecciones en micro-plantulas y foliolos donde el patógeno no llegó a esporular (Figura 9).

#### **DISCUSIÓN**

*P. sparsa* es un parásito, cuya pared celular en lugar de poseer quitina como la mayoría de los hongos verdaderos posee celulosa. Este agente infeccioso es un parásito fisiológicamente obligado; estos dos factores fueron cruciales para el establecimiento de las metodologías que nos llevaron a los resultados presentados.

Durante la producción de esporulaciones se observó tanto para la inducción a la esporulación de material recolectado en campo, como para el mantenimiento del inoculo en el laboratorio, que el contacto directo del tejido afectado con el agua sobre la superficie donde se produce la esporulación (el envés de la hoja), no es favorable para una esporulación de calidad, es decir, esporulaciones abundantes y libres de otros agentes infecciosos, esto quiere decir que *P. sparsa* tiene una mejor calidad de esporulación cuando la saturación de la humedad en el ambiente es cercana al 100% y no cuando el material afectado está directamente en contacto con agua (Figura 10).

Para la obtención de esferoplastos de *P. sparsa*, inicialmente se tomaron como reguladores osmóticos el sorbitol y el manitol a molaridades de 1.2 y 0.8 respectivamente, como lo reporta West y colaboradores (1999), Tanguay y colaboradores (2003) y Chakraorty y colaboradores (1990). En nuestro experimento las

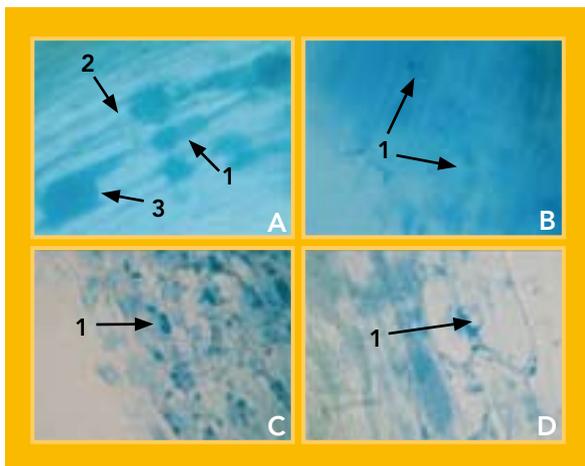


**Figura 6.** Las imágenes muestran la presencia de mildew veloso de la rosa en foliolos de campo. a. 1 apresorio, 2 hifas, b. 1 haustorios. Tinción con azul de lactofenol (100x).

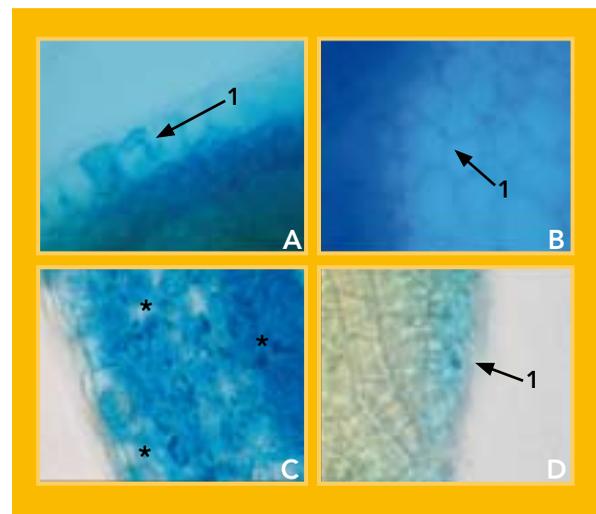
molaridades de estos reguladores fueron variando según los resultados observados. Con el sorbitol a una molaridad de 1.2 se logró mantener el esporangio osmóticamente estable, durante un periodo no mayor de 4 horas, mientras que con el manitol, a diferentes molaridades, el resultado fue un esporangio osmóticamente inestable ya que se presentaba lisis celular al

cabo de una o dos horas tanto para molaridades más altas (1.0 M) como lo reporta Judelson y colaboradores (1991), o molaridades bajas como lo reporta Schween, y colaboradores (1998). Por último se implementó el regulador osmótico KC como lo reporta para *Phytophthora infestans* Judelson y colaboradores (1991) y Champouret (1991), y para *Phytophthora parasítica* Bottin y colaboradores (1999). Con el buffer KC se logró mantener los esporangios osmóticamente estables durante 24 horas.

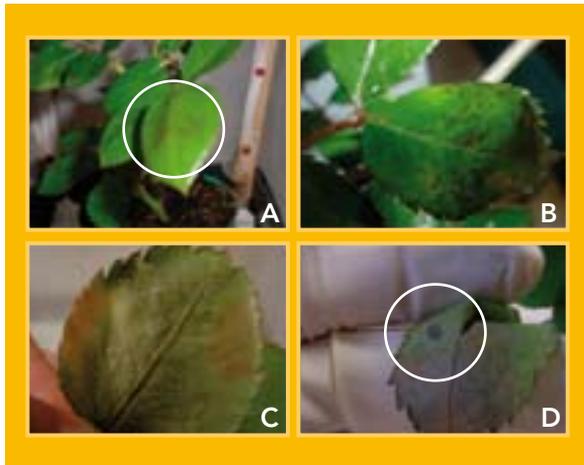
Con la implementación de buffer KC como un regulador osmótico se comenzó a evaluar las enzimas de digestión de la pared de los esporangios; inicialmente, se utilizaron celulasas; luego se usó driselasa como lo reporta para *Physcomitrella* Grimsley y colaboradores (1977). Se observó que la pared celular de los esporangios no tenía un cambio



**Figura 7.** a. infección con esferoplastos 24 h, 1 haustorios, 2 hifas, 3 Estructura redondeada gigante, (observadas también por Gómez, 2004, cuando la infección es severa) b. infección con esporangios, 24 h, 1 haustorios c. infección con esferoplastos, 96 h, 1 haustorios. d. infección con esporangios, 96 h, 1 haustorios. Tinción con azul de lactofenol, (100x).



**Figura 8.** a. infección con esferoplastos, 24 h, 1 haustorio b. infección con esporangios, 24h, 1 formación de haustorio c. infección con esferoplastos, 72 h, \* focos de haustorios. d. infección con esporangios, 72h, 1 haustorio. Tinción con azul de lactofenol (100x).

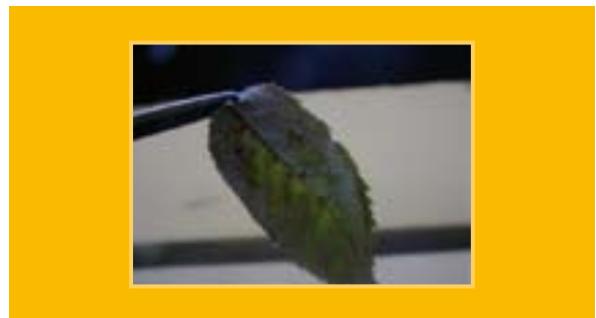


**Figura 9.** Infección con esferoplastos en plantas completas. a. 24h manchas pardas, b. 48 h, manchas cloróticas, c. 96 h esporulación d. 120 horas, tejido necrótico, esporulación atípica gris oscuro en puntos cloróticos.

significativo en cuanto a su grosor con relación al tiempo, esto se debía principalmente a que la pared celular de los peronosporales como *Peronospora*, *Phytophthora*, o *Pythium* está compuesta por Celulosa y  $\beta$ -glucanos; luego, se utilizó como enzima de digestión de la pared celular de los esporangios Fluka, que es un set de enzimas líticas como celulasas, glucanasas y quitinasas producidas por *Trichoderma harzianum*. El uso de Fluka para la formación de protoplastos es reportada para *Phytophthora parasítica* por Bottin (1999), Timberlake y colaboradores (1989), Judelson (1991) y Tanguay y colaboradores (2003). Para obtener los esferoplastos se usó una mezcla de Fluka con Driselasa y la concentración final se definió según Tanguay y Breuil (2003). Esta concentración es para una suspensión de esporangios ajustada en  $2 \times 10^4$  Esporangios/ml.

En cuanto a las infecciones realizadas se observó que las lesiones necróticas y la proliferación del patógeno dentro de los tejidos

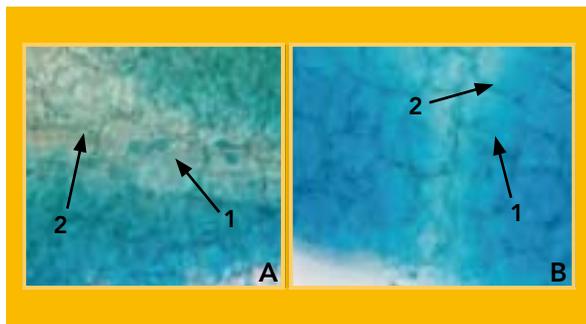
del folíolos, tanto de micro plántula como de campo, eran severas cuando se realizaron las pruebas de infección esferoplastos vs esporangios, con relación al tiempo de aparición de síntomas y el avance dentro del tejido, tanto para folíolos de micro plántulas como para folíolos de plantas que se encontraban en campo. Se observó claramente como aquellos folíolos infectados con esferoplastos respondían en un 50% más rápido a la enfermedad, pero al cabo de 48 horas la enfermedad ya no tenía por donde avanzar y el patógeno no llegaba a esporular, contrario a lo observado en los folíolos infectados con esporangios donde la enfermedad avanzaba regularmente y al cabo de 97 a 120 horas se podía observar la esporulación en el envés de los folíolos. También se observó una diferencia en la morfología de algunas estructuras como haustorios e hifas, ya que en los folíolos infectados con esferoplastos se observan haustorios que al parecer pierden turgencia e hifas sin cuerpos lipídicos contrario a lo que se observó en los tejidos infectados con esporangios. En este caso también se debe tener en cuenta el efecto que puede causar en el tejido vegetal el buffer MTC-10, en el que están re-suspendidos los



**Figura 10.** Foliolo con exudados cuando el tejido afectado está en contacto directo con agua.

esferoplastos en el momento de la infección, ya que a causa de las sales del buffer se pudo presentar una falta de turgencia generalizada en el tejido por deshidratación de las células.

La infección en plantas completas se realizó con el propósito de demostrar que la severidad con la que se presentaba la enfermedad en los folíolos no permitía que se diera la esporulación típica del mildew veloso, ya que posiblemente un folíolo de micro plántula o de campo en forma individual no es un hospedero que brinde los medios de supervivencia necesarios para llegar a una esporulación de este patógeno biotrofo. A pesar de la severidad de los síntomas a nivel microscópico las esporulaciones conservan la morfología típica, es decir que morfológicamente tanto para infecciones con esferoplastos como para infecciones con esporangios las esporulaciones observadas al microscopio no presentaron diferencias significativas, al igual que la esporulación atípica (una esporulación gris oscura alrededor de un punto clorótico, ver figura 9,d), que se presentó en la esporulación de la infección con esferoplastos.



**Figura 11.** Diferencias en las estructuras en la infección con esferoplastos vs esporangios a. 1 haustorio con baja turgencia 2 hifa sin cuerpos lipídicos b. 1 haustorio con forma típica redondeada 2 hifas con cuerpos lipídicos. Tinción con azul de lactofenol (100x).



**Figura 12.** Esporulaciones de infección con esferoplastos y esporangios, a. esporangioforo de la esporulación con esferoplastos b. esporangioforo de la esporulación con esporangios, Tinción con azul de lactofenol (40x).

Finalmente, según lo observado se puede inferir que la pared celular de los esporangios, juega un papel crucial en la supervivencia del patógeno, ya que los esferoplastos posiblemente al no tener que pasar por esta barrera para germinar, tienen una inmediata capacidad infectiva sobre el tejido, pero a la vez la imposibilidad de preservar esta capacidad de germinación lo lleva a una colonización agresiva que no le permite convivir con el hospedero sino al contrario llevarlo a una muerte rápida.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán en un futuro abordar la transformación de parásito de la rosa *P. parva* con genes reporteros por métodos como transformación con *Agrobacterium*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Universidad Militar "Nueva Granada" por la financiación de este trabajo a través del proyecto CIAS 2005 – 002.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 4 ed. Academic Press. USA.
2. Arbeláez, G. 1999. El mildew veloso del rosal ocasionado por *Peronospora sparsa* Berkeley. Acopaflo 6: 37-39.
3. Asocolflores, Colombian Association of Flower Exporters. 2007. Floriculture for Export. <http://www.asocolflores.com>. Consulta: Julio de 2009.
4. Bottin, A., Larche, L., Villalba, F., Gaulin, E., Esquerre, M., and Rickauer M. 1999. Green fluorescent protein (FP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. FEMS Microbiology Letters 176: 51-56.
5. Carlile, M.J. 1994. The fungi. Academic press. London. 125-141.
6. Chakraborty, B.N and Kapoor, M. 1990. Transformation of filamentous fungi by electroporation. Nucleic acids research, Vol. 18, No. 22. October. Oxford.
7. Cvitanič, C. and H. S. Judelson. 2003b. Stable transformation of the oomycete, *Phytophthora infestans*, using microprojectile bombardment. Current Genetics, 42:(4), 228-235.
8. Flórez, V. 1996. El papel de las fenilaminas en el manejo del mildew veloso en ornamentales. Acopaflo 3: 30-31.
9. Gómez, S. 2004 b. Estudio del efecto de algunas condiciones biológicas y climáticas que inciden sobre el desarrollo del mildew veloso de la rosa (*Peronospora sparsa*). Tesis de maestría en ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia.
10. Gómez, S y Arbeláez, G. 2005. Efecto de la temperatura en el periodo de latencia y producción de esporangios de *Peronospora sparsa* Berkeley en tres variedades de rosa. Agronomía Colombiana 23(2), 239 – 245.
11. Grimsley, N.H., Ashton, N.W., and Cove, D.J. 1997. The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss *Physcomitrella patens*. Molecular and general genetics 154: 97-100.
12. Hammer, T. R., M. Thines. and O. Spring. 2007. Transient expression of gfp in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechanoperforation method. Plant Pathology, 56:(1), 177-182.
13. Judelson, H., Tyler, B., and Milchemore, R. 1991. Transformation of the Oomycete pathogen, *Phytophthora infestans*. Molecular Plant- Microbe Interactions. Vol4, 6: 602-607.
14. Lamour, K. H., J. Win. and S. Kamoun. 2007. Oomycete Genomics: New insights and Future Directions. FEMS, Microbiological Letters, 274, 1 - 8.
15. Sargent, J.A. 1981. The fine Structure of the downy mildews. D. M. Spencer, ed. Academic Press, New York. 183-236.
16. Schiltz, P. 1981. Downy mildew of tobacco. En: The downy mildews. D.M. Spencer, ed. Academic Press, New York. 577-594.
17. Schween, G., Fleig, S., and Reski, R. 1998. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastics division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 4368-4373.
18. Spencer, D.M. 1981. The downy mildews. Academia Press. New York.
19. Madigan, M., Martinko, J., and Parker, J. 2001. Biología de los microorganismos. Octava edición revisada 74: 119-120.
20. Margullis. L. 1998. Five Kingdoms: An illustrated guide to the phyla of life on earth. Editorial Freeman. New York. 12-20.
21. Tanguay, P., and Breuil, C. 2003. Transforming the sapstaining Fungus *Ophiostoma piceae* with *Agrobacterium tumefaciens*. Can. J. Microbiol. 49: 301-304.
22. Timberlake, E., and Marshall, M., 1989. Genetic engineering fungi. Science, new series, Vol.244, 4910: 1313-1317.
23. Vijn, I. and F. Govers. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Pathology, 4:(6), 459-467.
24. West, P.V., Reid, B., Campbell, T., Sandrock, R., Fry, W., Kamoun, S., and Gow N. 1999. green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic Oomycete *Phytophthora palmivora*. FEMS Microbiology Letters 178: 71-80.