

## **PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE APLICADA AL ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE RAÍCES DE AGUACATE POR *Rosellinia necatrix*.**

C. Pliego-Prieto<sup>2</sup>, S. Kanematsu<sup>3</sup>, D. Ruano-Rosa<sup>4</sup>, C. López-Herrera<sup>4</sup>, A. de Vicente<sup>5</sup>, F.M. Cazorla<sup>5</sup> y C.Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Genética. Universidad de Málaga. 29071-Málaga, España. E-mail: crr@uma.es.

<sup>2</sup>IFAPA, Centro de Churriana. Junta de Andalucía. Finca Cortijo de la Cruz s/n. 29140. Churriana, Málaga, España.

<sup>3</sup>National Agriculture and Bio-oriented Research Organization. National Institute of Fruit Tree Science, Department of Apple Research 92-24 Nabeyashi, Shimoduriyagawa. Morioka, 020-0123, Japan.

<sup>4</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C, Apdo. 4084, Córdoba, España.

<sup>5</sup>Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. 29071-Málaga, España.

*Rosellinia necatrix* Prill. es un ascomiceto de suelo que causa la podredumbre blanca en un amplio rango de especies vegetales, especialmente árboles frutales. La podredumbre blanca es actualmente una de las enfermedades más importantes que afectan a las plantaciones de aguacate en Andalucía (España), así como a las de manzano, vid y peral en Japón. Los síntomas característicos de esta enfermedad son la podredumbre radicular, amarillamiento, decaimiento, caída de hojas, y finalmente, muerte del árbol. Aislados españoles y japoneses de *R. necatrix*, que mostraban diferentes grados de virulencia, se marcaron con la proteína verde fluorescente (GFP) mediante transformación de protoplastos con el plásmido pCPXHY1eGFP. Las frecuencias de regeneración de protoplastos y transformación variaron fluctuando entre  $10^{-5}/10^{-7}$  y  $10^{-2}/>10^{-3}$  por  $10\mu\text{g}$  de DNA, respectivamente. El análisis microscópico de los transformantes reveló homogeneidad de la señal fluorescente, siendo claramente visible y estable en las hifas. Actualmente, se está analizando la patogenicidad de los diferentes aislados silvestres y transformantes, evaluando el índice de enfermedad tras su inoculación en plantas de aguacate. Paralelamente, se está estudiando la colonización de raíces de aguacate por *R. necatrix*, así como la infección y desarrollo de la enfermedad *in vivo* mediante Microscopía Láser Confocal; los detalles de estos procesos serán esenciales para el control de la enfermedad. Éste es el primer trabajo en el que se describe la utilización de aislados de *R. necatrix* marcados con la proteína fluorescente verde para analizar el proceso de infección en raíces de aguacate por este patógeno.

**Palabras Clave:** *Persea Americana* Mill, *Rosellinia necatrix*, Podredumbre blanca, Proteína fluorescente verde.

## **GREEN FLUORESCENT PROTEIN APPLIED TO THE STUDY OF COLONIZATION AND INFECTION OF AVOCADO TREE ROOTS BY *Rosellinia necatrix***

C. Pliego-Prieto<sup>2</sup>, S. Kanematsu<sup>3</sup>, D. Ruano-Rosa<sup>4</sup>, C. López-Herrera<sup>4</sup>, A. de Vicente<sup>5</sup>, F.M. Cazorla<sup>5</sup> and C.Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Genética. Universidad de Málaga. 29071-Málaga, España. E-mail: crr@uma.es.

<sup>2</sup>IFAPA, Centro de Churriana. Junta de Andalucía. Finca Cortijo de la Cruz s/n. 29140. Churriana, Málaga, España.

<sup>3</sup>National Agriculture and Bio-oriented Research Organization. National Institute of Fruit Tree Science, Department of Apple Research 92-24 Nabeyashi, Shimoduriyagawa. Morioka, 020-0123, Japan.

<sup>4</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, C.S.I.C, Apdo. 4084, Córdoba, España.

<sup>5</sup>Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. 29071-Málaga, España.

*Rosellinia necatrix* Prill. is a soilborne ascomycete fungus that causes white root rot on a wide range of plant species, especially on fruit trees. White root rot is currently one of the most important diseases affecting avocado orchards in Andalusia (Spain) as well as apple, grape and pear orchards in Japan. Characteristic symptoms of this disease are rotting of roots, yellowing and falling of leaves, wilting and, finally, death of the tree. Spanish and Japanese isolates of *R. necatrix* showing different degrees of virulence were tagged with the green fluorescent protein (GFP) by protoplast transformation with plasmid pCPXHY1eGFP. Frequencies of protoplasts regeneration and transformation varied greatly among isolates and were  $10^{-5}/10^{-7}$  and  $10^{-2}/>10^{-3}$  per  $10\mu\text{g}$  of DNA, respectively. Microscopic analysis of the transformants revealed homogeneity of the fluorescent signal, which was clearly visible and stable in the hyphae. Currently, the pathogenicity of wild-type isolates and transformants is analysed, evaluating the disease index after its inoculation in avocado plants. Colonization, infection, and disease development on avocado roots infected with the transformants is being analyzed *in vivo* by scanning confocal laser microscopy; details of these processes will be essential for disease control. To the best of our knowledge, this is the first report describing the utilization of GFP-tagged *R. necatrix* derivatives to analyze the infection process of avocado roots by this pathogen.

## INTRODUCCIÓN

Las dos enfermedades más importantes que afectan al cultivo del aguacate son la podredumbre causada por el oomiceto *P. cinnamomi* y la podredumbre blanca causada por el hongo *Rosellinia necatrix*. Mientras *P. cinnamomi* afecta cultivos de aguacate en todo el mundo, las infecciones causadas por *R. necatrix* tienen importancia en zonas aguacateras del área mediterránea, principalmente Israel y España. Además, *R. necatrix* tiene un amplio rango de huéspedes y es muy destructivo en frutales, incluyendo especies tropicales como el mango y el aguacate. Los árboles afectados muestran podredumbre de raíces, amarilleamiento y caída de hojas y finalmente, muerte del árbol tras pocas semanas de la aparición de los primeros síntomas foliares.

En la actualidad, la información acerca del proceso de infección de *R. necatrix* en árboles es escasa. En 1952, se describió el proceso de infección de raíces de árboles de morera por éste hongo (Sakurai, 1952). Se observó que la invasión del hongo en raíces jóvenes, sin crecimiento secundario, ocurre tras la perforación y disolución de las paredes de las células de la corteza. Sin embargo, la invasión de los tejidos interiores de raíces adultas parece tener lugar principalmente a través de las lenticelas, generalmente formando cordones de hifas. Las células dañadas muestran decoloración marrón y

finalmente necrosis (Sakurai, 1952). La visualización microscópica del proceso de infección en aguacate por *R. necatrix* no se ha llevado a cabo hasta la fecha (Pérez-Jiménez, 2004).

La proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa *Aequorea Victoria* es una herramienta útil para el marcaje de patógenos con objeto de visualizar, mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, el proceso de infección de los mismos bajo condiciones *in vivo*. En este sentido, la visualización de organismos marcados con GFP, mediante microscopía laser confocal (MSLC), es una herramienta rápida, efectiva y no invasiva que permite el análisis espacio-temporal de las interacciones huésped-patógeno.

En éste trabajo, se describe la obtención de protoplastos y transformación con diferentes plásmidos marcados con GFP de distintas cepas de *R. necatrix* que muestran distinto grado de virulencia. La microscopía de epifluorescencia de estos transformantes reveló homogeneidad de la señal de fluorescencia debida a la expresión de la GFP, que era claramente visible en las hifas. El proceso de infección de las raíces de aguacate causado por *R. necatrix* fue estudiado usando MSLC.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Microorganismos y condiciones de cultivo*

Las cepas de hongo y los plásmidos usados en este estudio se indican en la Tabla 1. *R. necatrix* se cultivó a 25° C en potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit). El medio de cultivo se suplementó con 50 µg/ml de hygromicina B (HYG) cuando fue necesario.

### *Transformación de *R. necatrix**

La obtención de protoplastos se llevó a cabo según el protocolo descrito por Kanematsu et al. (2004). Las condiciones utilizadas para la preparación de protoplastos fueron: cultivos de micelio incubados sin agitación, solución osmótica de manitol, mezcla osmótico-enzimática que contenía zimoliasa 100T 0.4 % y enzimas líticas 1.5 %.

Para la transformación una suspensión de protoplastos y 10 µg del vector plasmídico se mezclaron suavemente en tubos Falcon e incubaron en hielo durante 30 min. Tras la adición de 500 µl de una solución de PEG [PEG 4000], la suspensión de protoplastos se mezcló con cuidado e incubó a 20 °C durante 20 min. A cada tubo se le añadieron 700 µl de medio de regeneración (Potato Dextrose Broth [PDB], Difco Laboratories, suplementado con 0.5 M de glucosa) y se incubó a 25 °C durante 7 días. Alicuotas que contenían 300 µl de protoplastos se sembraron en 10 ml de YCDA (0,1 % extracto de levadura, 0,1 % caseína hidrosilada, 0.5 M glucosa y 1,5% agar en una placa de petri de 9-cm) y se incubaron a 20 °C en oscuridad durante 2 semanas. La resistencia a HYG se comprobó añadiendo 10ml de medio PDA suplementado con 50 µg/ml de HYG.

### *Análisis microscópico*

El análisis microscópico de las hifas se llevó a cabo usando un microscopio de epifluorescencia Leica y un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Leica MZ FLIII), ambos equipados con bloques de filtro con propiedades espectrales adecuadas a las de la GFP (excitación 470/20-nm excitation, emisión a 515 onda larga).

### *Test de patogenicidad*

La patogenicidad de los aislados de *R. necatrix* marcados con GFP en comparación con sus correspondientes cepas silvestres se llevó a cabo en plantas de aguacate de 3, 6 y 12 meses de edad. Las plántulas se colocaron en macetas que contenían sustrato infectado con granos de trigo cubiertos con micelio de *R. necatrix*, tal y como se ha descrito anteriormente (Freeman et al. 1986, Pliego et al. 2007).

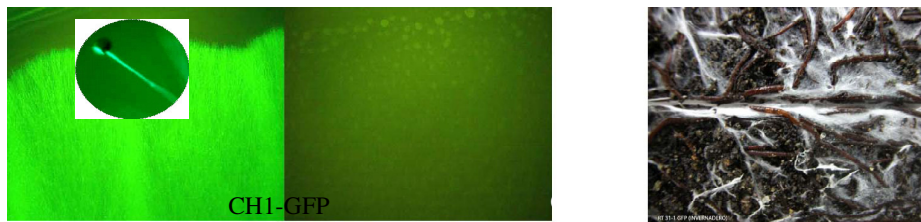
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Distintos aislados de *R. necatrix*, con diferentes grados de virulencia y procedentes de Japón y España se marcaron con GFP. Mientras que los aislados españoles CH1, CH2, CH3 y CH4 mostraron un alto grado de virulencia, CH5 y CH6 no inducen síntomas de podredumbre en plantas de aguacate. RT1 y RT2 se aislaron en Japón a partir de raíces de árboles enfermos de peral, mostrando un alto grado de virulencia en peral y aguacate (datos no mostrados). Se llevaron a cabo varias aproximaciones diferentes para la transformación de los aislados de *R. necatrix*. En una primera aproximación, se realizaron transformaciones de micelio de *R. necatrix* mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo el protocolo de Zhang et al. (2003) para *Glarea lozoyensis* con algunas modificaciones. Para ello, se utilizó un derivado plasmídico de pRK2 que contiene el gen Hyg<sup>R</sup> fusionado al gen *gfp*. Éste plásmido se transformó en cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404 (Hoekema et al. 1983). No se obtuvieron transformantes mediante éste método.

En un segundo ensayo, se realizaron experimentos de regeneración y transformación de protoplastos de acuerdo con el protocolo descrito por Satoko et al. 2004. Se obtuvieron aproximadamente  $10^7$ - $10^8$  protoplastos por g de micelio por cada una de las cepas de *R. necatrix* estudiadas. El tamaño de los protoplastos varió mucho entre los aislados. Mientras que para las cepas CH2 y CH4 se obtuvieron protoplastos redondos y claramente visibles, para CH1 y CH6 se observaron protoplastos más pequeños; en los restantes aislados se obtuvieron tamaños intermedios. Las frecuencias de regeneración de protoplastos variaron entre las distintas cepas alcanzando valores alrededor de  $10^{-5}$ / $10^{-7}$  para CH1, CH4, CH5, CH6, RT1, RT2 y  $10^{-2}$ / $10^{-3}$  para CH2 y CH3. No se observó correlación entre tamaño de los protoplastos obtenidos y su frecuencia de regeneración.

Se utilizaron dos vectores diferentes marcados con GFP para la transformación de protoplastos de *R. necatrix*: a) co-transformación de los plásmidos pGPD-GFP y pAN7-1 que contienen los genes *gfp* y Hyg<sup>R</sup>,

respectivamente y, b) transformación con el plásmido pCH-GFP, que contiene los genes *gfp* y *Hyg<sup>R</sup>* (Tabla 1). No se aislaron transformantes de ninguno de los aislados testados mediante co-transformación con pGPD-GFP y pAN7-1. Sin embargo, se aislaron transformantes de 5 aislados diferentes (CH1, CH5, CH6, RT1 y RT2) usando el plásmido pCH-GFP. Tampoco se obtuvieron transformantes de CH2, CH3 y CH4 con éste plásmido (Tabla 1). El análisis mediante microscopía de epifluorescencia de los transformantes reveló homogeneidad de la señal verde fluorescente, que era claramente visible en las hifas de los cinco transformantes GFP. La Fig.1 muestra los resultados obtenidos para *R. necatrix* CH1-GFP en comparación con la cepa silvestre CH1. La expresión de la GFP no afectó a la patogenicidad de los distintos transformantes, dado que el desarrollo de la enfermedad fue idéntico en las plantas de aguacate infectadas con las cepas silvestres y con los derivados-GFP. En todas las plántulas testadas (1 año, 6 meses y 3 meses de edad) los síntomas aéreos comenzaron por el amarilleamiento de las hojas, marchitez y finalmente, muerte de la planta. También se observaron en todos los casos agregados de micelio invadiendo las raíces de aguacate seguido de podredumbre radicular también fueron observados (Fig.1B). GFP-CH5 y GFP-CH6 no indujeron el desarrollo de la enfermedad en ninguno de los casos testados (datos no mostrados).



**Figura1.** Emisión de fluorescencia por CH1-GFP y su correspondiente cepa parental CH1 (A). En la esquina superior izquierda se muestra una imagen en detalle de una hifa para CH1-GFP. B. Podredumbre blanca causada por el derivado GFP-CH1 en plantas de aguacate de un año de edad.

En la actualidad, estamos llevando a cabo inoculaciones artificiales en plantas de aguacate con derivados GFP de *R. necatrix* para visualizar el proceso de infección de raíces de aguacate por este hongo utilizando diferentes técnicas de microscopía de epifluorescencia.

Resultados preliminares han mostrado que, tal y como se había descrito en raíces de manzano (Labrouhe, 1982), se pueden diferenciar distintas fases de desarrollo de la enfermedad. Inicialmente, se observa una proliferación externa de hifas a lo largo de la superficie como micelio difuso o formando cordones. Posteriormente, la penetración de agregados de micelio en tejidos jóvenes parece ocurrir en distintos puntos de la raíz entre células de la epidermis. La penetración es seguida de una invasión y desorganización del parénquima cortical. Además, se están llevando actualmente investigaciones dirigidas al estudio de la penetración del hongo en tejidos más viejos. Un estudio detallado de la infección de raíces de aguacate por *R. necatrix* contribuirá sin duda al

desarrollo de métodos más eficientes para controlar la podredumbre blanca, tal y como se ha demostrado en estudios de control biológico de otros hongos patógenos como, por ej., *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en raíces de tomate (Bolwerk A. et al. 2003).

## REFERENCIAS

- Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijffjes AH, Lamers GE, Chin-A-Woeng TF, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16 (11):983-93.
- Freeman, S., Sztejnberg, A., Chet, I. (1986) Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. *Plant and Soil* 94: 163-170.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179–180
- Kanematsu, S, Arakawa, M, Oikawa, Y, Onoue, M, Osaki, H, Nakamura, H, Ikeda, K, Kuga-Uetake, Y, Nitta, H, Sasaki, A, Suzaki, K, Yoshida, K, Matsumoto, N (2004) "A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. *Virology* 94: 561-568
- Lagopodi, A.L., Ram, A.F.J., Lamers, G.E., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Lugtenberg, B.J.J., and Bloemberg, G.V. 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis and using the green fluorescent protein as a marker. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:172-179.
- Perez-Jimenez, R. 2006. A Review of the Biology and Pathogenicity of *Rosellinia necatrix*– The Cause of White Root Rot Disease of Fruit Trees and Other Plants. *J. Phytopathol*, Vol. 154, 5: 257-266.
- Pliego C., Cazorla F.M., González-Sánchez M.A., Pérez-Jiménez R.M., de Vicente A., Ramos C. (2007) Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology.* 158: 463-470.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Powels, P.H., and van den Hondel, C.A.M.J.J. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin-B marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124.
- Sakurai Y., 1952. Patológico-anatomical observations on the white root rot of Mulberry trees caused by *R. necatrix* (Hart.) Berl. *Tes. Fac. Text. Seric.*, Shinshu Univ., 2: 18-26.
- Tourvieille de Labrouhe. D. 1982. Pénétration de *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. dans les racines du pommier en conditions de contamination artificielle. *Agronomie.* 553
- Zhang A., Lu P., Dahl-Roshak A.M., Pares P.S., Kennedy S., Tkacz J.S., An Z. 2003. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pks1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol. Gen Genomics.* 268 : 645-655.