

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPORAS DE *THECAPHORA SOLANI* A TRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL Y TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Méndez, Karla S.^a; Ramírez, Patricia V.^a; Pachacama, Silvia F.^a; Aponte Pedro M.^{a, b*}

^aAGROCALIDAD, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD, Coordinación General Laboratorios, Km 14^{1/2} Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, Tumbaco, ECUADOR

^b SENESCYT, Secretaría Nacional de Educación Ciencia y Tecnología / Proyecto Prometeo, ECUADOR

Ingresado: 30/04/2015

Aceptado: 14/08/2015

Resumen

El carbón de la papa es una plaga cuarentenaria causada por *Tecaphora solani*, un relevante hongo fitopatógeno distribuido geográficamente desde México hasta países andinos de Sudamérica. Sus esporas desarrollan latencia y sobreviven en el suelo por muchos años. Debido a esto *T. solani* representa un importante modelo de hongo fitopatógeno. Debido a que gran parte del conocimiento de la biología fúngica se basa en la identificación de sus estructuras internas, nos planteamos como objetivo el uso de técnicas morfológicas (histotecnología y microscopia confocal - MC) para el estudio del modelo *T. solani*. Láminas con suspensiones de esporas fueron preparadas para su observación por MC. Otras muestras fueron incluidas en agar para seguidamente ser procesadas histológicamente y observadas por microscopia de campo claro. Aspectos internos de estructuras autofluorescentes de las esporas pudieron ser identificadas por MC. Estas mismas estructuras pudieron observarse en preparaciones de cortes histológicos. MC es una técnica rápida para la identificación y descripción de estructuras internas en esporas de hongos. Las técnicas utilizadas abren las puertas para el estudio de nuevos aspectos morfológicos y fisiológicos de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: Hongos, esporas, *Thecaphora solani*, microscopia confocal, histología.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *THECAPHORA SOLANI* SPORES VIA CONFOCAL MICROSCOPY AND HISTOLOGICAL TECHNIQUES

Abstract

Potato smut is a quarantine pest caused by *Tecaphora solani*, a relevant phytopathogenic fungus geographically distributed from Mexico to Andean Southamerican countries. Their spores develop latency and survive in the soil for many years. Because of this, *T. solani* represents an important model of phytopathogenic fungus. Because a great deal of the fungus biology knowledge relies on its internal structures, we aimed to use morphological techniques (histotechnology and confocal microscopy – CM) for the study of the *T. solani* model. Slides with spore suspensions were prepared for observation with CM. Other samples were embedded in agar and histologically processed and observed under bright field microscopy. Internal aspects of autofluorescent structures of the spores could be identified with CM. The same structures could be seen in histological sections. CM is a fast technique for identification and description of internal structures of fungal spores. The techniques used open venues for the study of new aspects of morphology and physiology of phytopathogenic fungus.

Keywords: Fungus, spores, *Thecaphora solani*, confocal microscopy, histology

I. INTRODUCCIÓN

El carbón de la papa es causado por *Tecaphora solani*, un importante fitopatógeno de los países andinos de Sudamérica [1], México y América Central. Este hongo

* Correspondencia a: Pedro Aponte, AGROCALIDAD, Laboratorio de Diagnóstico Animal, Km 14^{1/2} Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, Tumbaco, Ecuador. Teléfono: ++593 02 2372844, ext 223. email: apontep@gmail.com

por ser considerado una plaga cuarentenaria en la mayoría de países en los cuales se aloja [2] es sujeto al control y restricción de importación por parte de los organismos nacionales de control fitosanitario al detectarse su presencia. El cultivo de papa es su principal huésped, sin embargo algunas otras especies de *Solanum spp.* pueden presentar este hongo. Cuando los cultivos son afectados, *T. solani* origina grandes pérdidas económicas, especialmente porque esta enfermedad puede diseminarse a largas distancias debido a la comercialización del tubérculo [3], razón por la cual es declarada una enfermedad cuarentenaria.

El síntoma principal que *T. solani* causa es el desarrollo de tumores verrugosos en la superficie del tubérculo y una cantidad considerable de puntos o manchas de color negro a marrón en la cáscara. Las esporas de *T. solani* desarrollan un estado de latencia, sobreviven en el suelo por años y pueden diseminar la enfermedad cuando las papas se plantan nuevamente en el suelo infectado. [2]

Además de su importancia como agente fitopatológico para el Ecuador y otros países andinos así como de la característica biológica de sus esporas de diseminarse y poder permanecer en el medio ambiente, consideramos a esta especie como un importante modelo dentro de los hongos fitopatógenos portadores de esporas. La clasificación taxonómica de un hongo generalmente se basa en la observación de estructuras reproductivas sexuales o asexuales. Para la identificación de enfermedades fitopatógenas se consideran características de gran importancia taxonómica como la pigmentación, forma y topología de las estructuras tales como conidias, células conidiogénicas, conidióforos y fructificación conidial.

Para ilustrar esto, estudios sobre el género *Aspergillus* demuestran la existencia de aproximadamente 175 especies únicamente a través de la caracterización morfológica de células conidiogénicas y conidias [4]. De esta manera, en muchos casos, el conocimiento de la biología fúngica se basa en la identificación de estructuras internas. Así, el presente estudio tiene por objetivo el uso de técnicas morfológicas para la descripción de un tipo de esporas producidas por un hongo fitopatógeno utilizando técnicas histológicas (microscopía de campo claro) y microscopía confocal (MC) para la identificación de *T. solani*, un miembro del Orden Ustilaginales en los Basidiomicetes como modelo de una plaga cuarentenaria.

II. RESULTADOS

La morfología general de las esporas de *T. solani* pudo ser evidenciada a través de las técnicas de MC con preparaciones de esporas enteras y de microscopía de campo claro con cortes histológicos. Ambas técnicas permitieron evidenciar la estructura interna de las esporas. En los cortes histológicos se evidencia el núcleo, citoplasma, paredes celulares interna y externa y rugosidades externas. El núcleo presenta basofilia, es decir muestra gran afinidad por el colorante hematoxilina, y está ubicado generalmente en posición central y presentando cromatina altamente compactada (Figura 1). La técnica confocal permitió así mismo evidenciar estructuras autofluorescentes. Las estructuras que evidenciaron esta propiedad fueron principalmente la pared celular externa, el núcleo y en menor grado el citoplasma y las rugosidades externas,

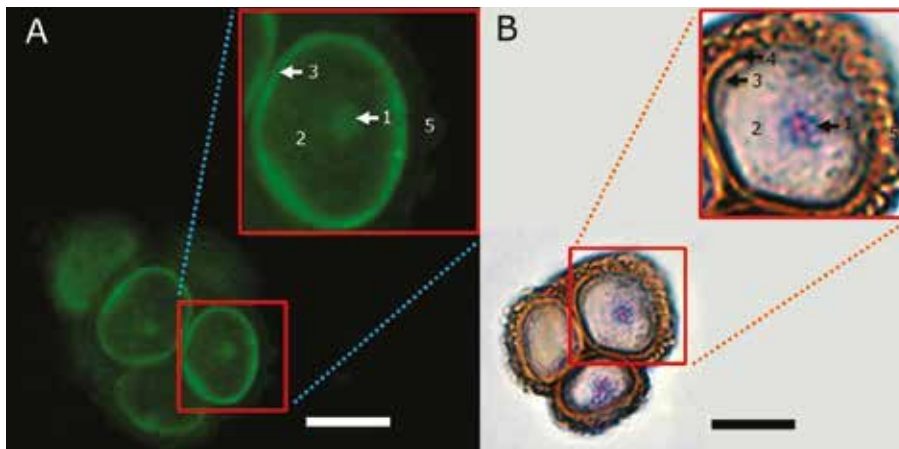


Figura 1. Corte óptico por microscopia confocal (A) y corte mecánico a través de técnicas histológicas y visualizado por microscopia óptica de campo claro (B) de bolas de esporas de *Thecaphora solani*. El recuadro superior ampliado muestra algunas estructuras de una espора: 1- núcleo; 2- citoplasma; 3- pared celular interna; 4- pared celular externa (no observable en la imagen confocal por no poseer autofluorescencia); 5- rugosidad u ornamento externo. Tinción Hematoxilina de Harris. Barra = 20 μm .

mientras que la pared celular externa no es autofluorescente (Figura 1). Las esporas se agrupan en bolas de esporas de forma oval con una capa externa rugosa común (rugosidades u ornamentos externos) mientras que los espacios inter-esporas poseen superficies lisas. La relación núcleo:citoplasma de las esporas es baja (núcleo pequeño en comparación al extenso citoplasma).

III. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió realizar una descripción morfológica de las esporas de *T. solani*, utilizando técnicas de microscopia avanzadas (MC) y la adaptación de las técnicas histológicas a elementos tan pequeños. Así, las dimensiones de las bolas de esporas de *T. solani* han sido estimadas en 15-50 μm (eje mayor) x 12 – 40 μm (eje menor) [5], es decir no son observables sin la ayuda de un microscopio.

Las imágenes confocales de alta resolución permitieron evidenciar estructuras autofluorescentes en las esporas. Estas estructuras se observaron en disecciones ópticas, en las que gracias a la tecnología confocal, se obtienen secciones ópticas o planos específicos de interés del espécimen en estado de foco en el sistema de lentes del microscopio. Llama la atención la fuerte autofluorescencia del núcleo y de la pared celular interna de las esporas. Esta característica permitiría, en este tipo de esporas, predecir la fertilidad de las mismas. Las esporas estériles carecen de célula [6] y por lo tanto la evidencia de un núcleo fuertemente autofluorescente facilitaría la evaluación de la presencia de esporas viables. [7] La autofluorescencia es un fenómeno de algunas pero no todas las esporas de hongos [8] lo cual trae como ventaja el no ser necesario utilizar sondas fluorescentes para su estudio. Por el contrario, de requerirse utilizar este tipo de marcadores, deberá tomarse en cuenta las longitudes de onda de emisión de dichos fluoróforos de manera que su espectro de emisión no se superponga con el de los constituyentes celulares autofluorescentes.

En nuestro trabajo, la histología de las esporas de *T. solani* permitió evidenciar, aunque con menor resolución, todas las estructuras previamente descritas a través de la técnica de microscopia electrónica de transmisión Andrade et al., 2005. Nuestra técnica, basada en la inclusión de esporas en parafina, abre la posibilidad de realizar técnicas de biología celular y molecular en esporas y otras estructuras microscópicas de organismos fungales, tales como inmunohistoquímica, hibridización *in situ* tradicional y fluorescente (FISH), entre otras. Las técnicas utilizadas abren las puertas para el estudio de nuevos aspectos morfológicos y fisiológicos de hongos fitopatógenos.

IV. METODOLOGÍA

Material biológico y procesamiento para microscopia.

Las esporas fueron aisladas en el Laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD bajo protocolos de bioseguridad, de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad Puca llungo, recolectadas en la región norte de la provincia de Tungurahua, Ecuador, a 2803 msnm, en una zona con temperatura promedio de 13°C y pluviosidad de 700 mm/año.

Muestras de papas fueron lavadas con agua destilada y secadas con toallas de papel limpias. Cada papa fue cortada en dos mitades y las prominencias que contenían las esporas fueron cuidadosamente retiradas. Las bolas de esporas fueron removidas con una hoja de bisturí y colocadas en un vial conteniendo 200 μl de agua destilada. Para el presente estudio se realizó un pool proveniente de cuatro muestras diferentes.

El procedimiento para el montaje de las bolas de esporas fue adaptado de un protocolo para fijación de nematodos [9], procedimiento con una duración de 20 min. La esporas fueron colocadas en una lámina portaobjetos con 2 μL de glicerina al 98%. La gota con la suspensión de esporas resultante fue inmediatamente rodeada con un trazado de parafina derretida. Paralelamente, una lámina cubreobjetos fue calentada ligeramente con un mechero de alcohol e inmediatamente colocada encima de la suspensión de esporas.

Para el procesamiento histológico, las esporas no fueron fijadas previamente. Las esporas fueron incluidas en parafina, previa inclusión en agar. [10] Brevemente, una gota suspensión de esporas fue rápidamente mezclada con una gota de agar (Difco Agar Noble, Becton Dickinson, USA) al 1% a 41°C en un vial de capacidad 1,5 ml y dejada enfriar a temperatura ambiente. El bloque de agar fue desmoldado cuidadosamente del vial y colocado en un cassette de inclusión de tejidos para su procesamiento histológico.[10] Este último fue realizado en un histoprocador automático de tejidos (Slee mtm, Mainz, Alemania) y los tejidos fueron incluidos en parafina. Posteriormente, los bloques fueron seccionados a 5 μm de grosor, desparafinizados y coloreados con hematoxilina Harris en láminas portaobjetos.

Para la observación confocal se utilizó un microscopio LSCM Olympus FV1000, Modelo BX61W1 con diodo laser LD 473 nm. El software utilizado fue Fluoview 3.5 FV10-ASW. La observación fue realizada con objetivos UMPlan FL N10X, y LUMPlan FL N60X ambos para inmersión en agua. El filtro Alexa Fluor 488 fue el apropiado para la detección del ancho de banda de autofluorescencia de las esporas.

Imágenes digitales fueron capturadas directamente por el software del microscopio confocal, mientras que imágenes provenientes de los cortes histológicos fueron capturadas con una cámara digital (Olympus DP73, Tokyo, Japan).

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero y logístico por parte de las Coordinaciones de Laboratorios y de Sanidad Animal de AGROCALIDAD, así como del Proyecto Prometeo / SENESCYT, Ecuador.

Referencias

- [1] M.J. O'Brien, M.J. Thirumalachar, "The identity of the potato smut", *Sydowia*, vol 26, no. 1-6, pp.199–203, 1972.
- [2] I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, K.M. Harris, "Data Sheets on Quarantine Pests. *Thecaphora solani*", En: Smith, I.M. (ed), *Quarantine Pests for Europe*. CAB International-European and Mediterranean Plant Protection Organization..1032 pp, 1992
- [3] G. Muñoz, R. Galdames, O. Andrade, "*Thecaphora solani*, agente causal del carbón de la papa: Antecedentes históricos", En Andrade, O. (ed.), *El carbón de la papa, avances en la etiología y control de la enfermedad*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Temuco, Chile. pp. 17–21, 2005a.
- [4] O. Andrade, G. Muñoz, R. Galdames, P. Durán, R. Honorato, "Characterization, In Vitro Culture, and Molecular Analysis of *Thecaphora solani*, the Causal Agent of Potato Smut", *Phytopathology*, vol 94, no 8, pp. 875–882, Agosto, 2004.
- [5] R. Zachmann, D. Baumann, "*Thecaphora solani* on potatoes in Peru: present distribution and varietal resistance", *Plant Dis Rep.*, vol 59, no 11, 928–931, 1975.
- [6] O. Andrade, G. Muñoz, R. Galdames, "*Thecaphora solani*, agente causal del carbón de la papa: Morfología y cultivo in vitro de *T. solani*", En Andrade, O. (ed.), *El carbón de la papa, avances en la etiología y control de la enfermedad*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Temuco, Chile. pp. 35–42, 2005.
- [7] C.H. Wu, H. L. Warren, "Natural Autofluorescence in Fungi, and Its Correlation with Viability." *Mycologia*, vol 76 no 6, pp. 1049–1058, noviembre, 1984.
- [8] J.L. Mann, "Autofluorescence of Fungi: An Aid to Detection in Tissue Sections." *American Journal of Clinical Pathology*, vol 79, no 5, pp. 587–590, mayo, 1983.
- [9] A. Van Eck, R. Eguiguren, M. Défaz, J. Revelo, G. Cedeño, "Técnicas en Laboratorio en Nematología", *Boletín Técnico* no. 54. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. E.E. Santa Catalina.

Quito, Ecuador. pp 29. 1984.

- [10] P.M. Aponte, T. Soda, K.J. Teerds, C.S. Mizrak, H.J. van de Kant, D.G. de Rooij, "Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro", *Reproduction*, vol 136, no 5, pp. 543–557, noviembre 2008.