

AISLAMIENTO DE RESISTENCIAS A FUNGICIDAS EN PODOSPORA ANSERINA

Ferrer, S., Ramón-Vidal, D. y Salom, J. (*)

RESUMEN

La manipulación genética se ha convertido en un método corriente de análisis y caracterización de genes eucarióticos y sus productos. Los hongos constituyen un grupo de organismos los cuales han demostrado ser muy útiles para la elucidación de algunos principios genéticos, y *Podospora anserina* ha sido uno de ellos. Sin embargo, la mayoría de los mutantes obtenidos hasta el presente en esta especie lo han sido de tipo morfológico, lo cual no facilita mucho la selección de los productos obtenidos tras la manipulación.

La posesión de un plásmido mitocondrial por parte de *P. anserina* hace que sea aún más interesante la genética de este hongo, abriendo un nuevo camino hacia los procesos de transformación de células eucarióticas y consecución de un posible vehículo de clonación para hongos filamentosos.

En el presente trabajo se describen los procesos para la obtención de cepas resistentes a diferentes antifúngicos inhibidores del crecimiento, con las cuales sea posible la obtención de una serie de marcadores claros, sencillos y fácilmente utilizables para procesos de manipulación genética.

SUMMARY

Isolation of fungicide resistances in *Podospora anserina*

Genetic manipulation has become a common method for the analysis and characterization of eukaryotic genes and their products. Fungi are a group of organisms which have proven very useful in elucidating certain genetic principles, and *Podospora anserina* has been one of them. However, most of the obtained mutants hitherto in this species are morphological, and they do not help very much in the selection of the manipulation products.

As *P. anserina* has a mitochondrial plasmid, the genetics of this fungus becomes more interesting, and opens a new way for the transformation processes in eukaryotic cells and construction of a possible cloning vehicle in filamentous fungi.

In this work are described the processes for the isolation of resistant strains to different antifungic inhibitors, which can be useful for the obtention of easy, simple and clear markers useful for the genetic manipulation processes.

(*) Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de València. Burjasot, València.

INTRODUCCION

Podospora anserina es un ascomycete heterotálico cuyo ciclo de vida es muy parecido al de *Neurospora crassa* (ESSER, 1974), y es un organismo eucariota muy adecuado para estudios bioquímicos y de análisis genéticos (COPPIN-RAYNAL, 1977). Además es portador de un plásmido de origen mitocondrial (STAHL *et al.*, 1978), lo cual resulta interesante en base a su utilización como vector de clonación en experiencias de DNA recombinante.

Aunque se ha descrito la existencia de numerosos mutantes de *P. anserina*, la mayoría lo son de modificaciones en el crecimiento (ESSER, 1974), y no se dispone en la actualidad de marcadores genéticos que sean estables, claros, sencillos y sobre todo fácilmente seleccionables, y que puedan servir no sólo para experiencias de análisis de tétradas sino también para la realización de experimentos de transformación y fusión de protoplastos en este hongo filamentoso.

El presente trabajo va encaminado a la consecución de este tipo de mutantes basado en la resistencia a diferentes inhibidores del crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

Se ha utilizado la cepa salvaje *s +* de *Podospora anserina*, cedida gentilmente por el Dr. Karl Esser del Lehrstuhl für Allgemeine Botanik de la Ruhr Universität.

El medio de crecimiento empleado en todos los casos fue el de extracto de harina de maíz (CMM) preparado según ESSER, (1974). Para el crecimiento en sólido se empleó el mismo medio adicionado de agar al 2% (ACMM). Para la regeneración de protoplastos se adicionó sacarosa al 20% como estabilizante osmótico (SACMM).

Los protoplastos se liberaron según el método propuesto por RAMÓN (1983). Siguiendo este mismo trabajo se prepararon las suspensiones de micelio y microconidios.

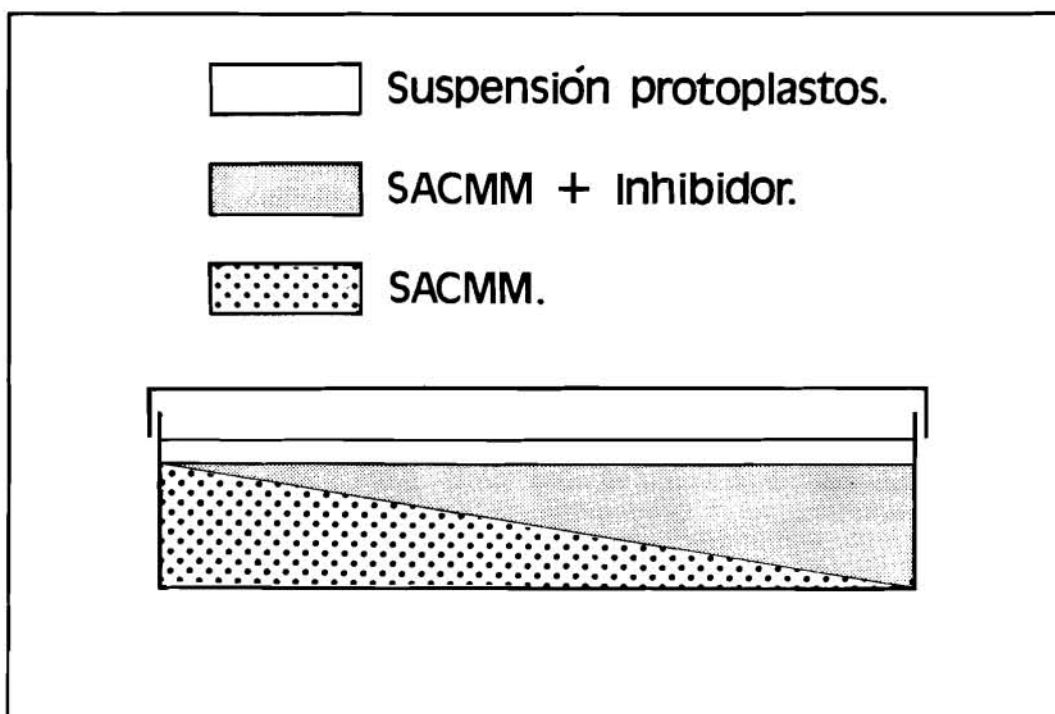


FIGURA 1.—ESQUEMA DE UN GRADIENTE LINEAL EN PLACA DE UN INHIBIDOR, en el caso de protoplastos de *P. Anserina*.

Se han elegido para este trabajo los antifúngicos Cloramfenicol (Cap) de Acofarma, Cicloheximida (Chx) de Sigma, Acriflavina (Acr) de Sigma, Imazalil (Ima) de Pennwalt y Benlate (Ben) de Du Pont, ya que las resistencias a estos inhibidores pueden ser debidas en principio a un sólo gen y ésto es muy conveniente en este tipo de estudios (VAN TUYL, 1977). Así pues se han determinado las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada uno de estos inhibidores a nivel de micelio y protoplastos y de dos maneras distintas. La primera de ellas ha consistido en la siembra del hongo en placas con concentraciones seriadas de cada inhibidor (VAN TUYL, 1977), determinándose en cada caso el porcentaje de supervivencia y viendo así la concentración a partir de la cual ya no se detectaba crecimiento. La segunda se basa en la creación de un gradiente lineal de concentración en una sola placa tal conforme se muestra en la Figura 1, y donde la concentración de inhibición se hallará en el punto a partir del cual no existe crecimiento. Con estos datos se han establecido

los niveles de selección y concentración máxima para el crecimiento de la cepa salvaje y las diferentes cepas resistentes.

A continuación, se ha cuantificado el efecto letal y mutagénico de distintas dosis de radiación ultravioleta (UV) sobre *P. anserina*, para determinar cual era el tratamiento óptimo de cara a la obtención de este tipo de marcadores. Se ha seguido el protocolo descrito por FERRER *et al.* (1982) pero utilizando suspensiones de microconidios, micelio o protoplastos.

Finalmente, una vez caracterizados todos los valores para la dosis de mutagenicidad óptima, CMI y concentración de selección de cada inhibidor, se ha pasado a la obtención directa de los resistentes a cada antifúngico.

RESULTADO Y DISCUSION

En primer lugar se han calculado las CMI, para cada inhibidor y según los dos métodos descritos. El ejemplo concreto del Benlate se muestra en la Figura 2. En él se

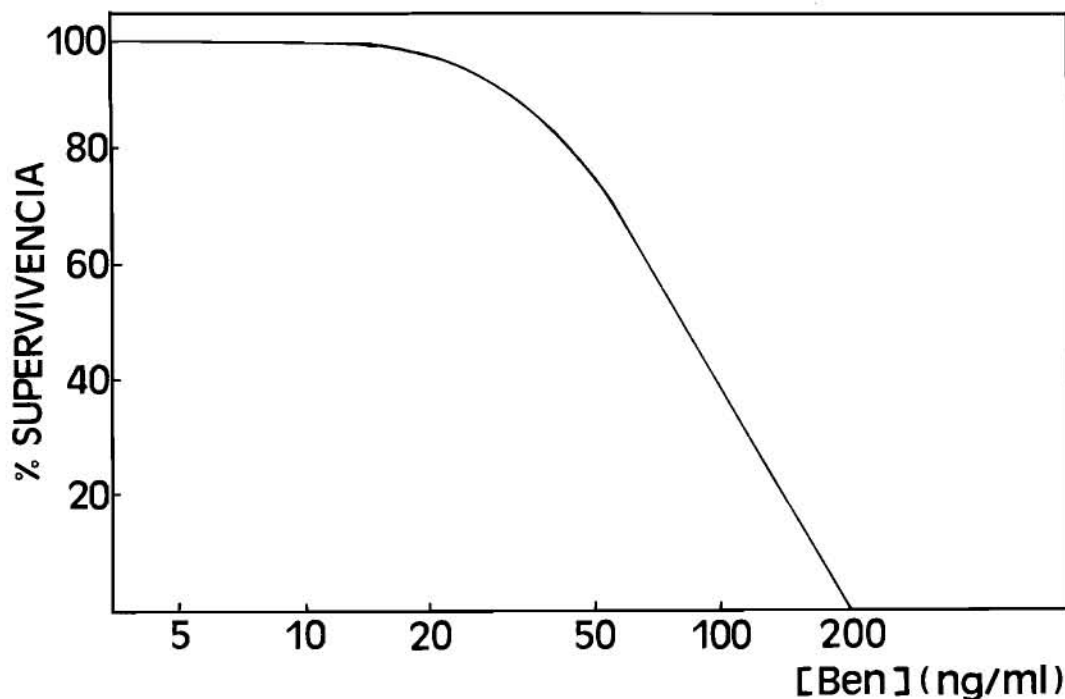


FIGURA 2.-CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA para el Benlate en protoplastos de *P. anserina*.

puede ver que el crecimiento es normal hasta una concentración de 20 ng/ml del inhibidor y a partir de aquí el efecto de la concentración del inhibidor es lineal respecto a la supervivencia, alcanzándose un crecimiento cero o CMI para 200 ng/ml. Un punto a destacar lo constituye el hecho de que en todos los casos estudiados los valores de CMI obtenido por la siembra en placas seriadas o bien en gradiente lineal han sido idénticos, dando una idea de la repetitividad del proceso. Por lo tanto se ha seguido utilizando en adelante el sistema del gradiente lineal dada la simplicidad y economía del mismo.

Los valores pues así obtenidos para las

CMI, a los distintos antifúngicos y calculadas para micelio y protoplastos se resume en la Tabla 1, y también la concentración de selección que se determinó en cada caso en función de los datos obtenidos. Hay que resaltar que si bien en el caso del Benlate y Cloramfenicol los datos para micelio y protoplastos han sido idénticos, en algunos casos los protoplastos han podido resistir mejor la acción del agente químico (Ima y Acr) mientras que en otros se ha dado la situación inversa (Chx). Estos resultados entran dentro de los valores esperados, sobre todo si se tiene en cuenta el mecanismo de acción de los antifúngicos (VAN TUYL, 1977).

TABLA 1

SENSIBILIDAD de *Podospora anserina* a nivel de micelio y protoplastos frente a diferentes inhibidores.

INHIBIDOR	<i>Acr</i>		<i>Ben</i>		<i>Cap</i>		<i>Chx</i>		<i>Ima</i>	
	Mic	Prot	Mic	Prot	Mic	Prot	Mic	Prot	Mic	Prot
Mat. Biológico										
CMI ($\mu\text{g/ml}$)	3,2	10	0,2	0,2	3400	3100	8,3	4,2	1,5	3
Concentración de selección ($\mu\text{g/ml}$)	5	12	0,5	0,5	5000	5000	10	5	2	5

Una vez calculados los valores de concentración de selección para cada inhibidor, se pasó a efectuar curvas de supervivencia a la luz UV por parte de microconidios, micelio o protoplastos, y poder establecer de este modo la dosis óptima para cada material. Las curvas de supervivencia se reflejan en la Figura 3, donde se aprecia claramente que el micelio es el que mejor resiste el tratamiento, debido seguramente a que por cada trozo de hifa contamos con varios núcleos (existe un núcleo por septo), y por lo tanto hay que aumentar mucho la dosis para obtener la misma tasa de letalidad. Por otra parte, los microconidios son más resistentes que los protoplastos, y aunque en principio ambos tienen un núcleo por célula (RAMÓN, 1983), las esporas poseen una pared bastante engrosada, con lo cual se dificulta la llegada de la radiación al material nuclear. Con todo, el micelio es muy resistente a la radiación UV, y hay que emplear grandes dosis; por su parte los

microconidios poseen una baja tasa de germinación (10^{-5} en el mejor de los casos), con lo que se dificulta mucho el proceso; y los protoplastos finalmente han mostrado ser idóneos para este tipo de experiencias.

Lo último que quedaba pues antes de pasar a la obtención de las cepas resistentes era calcular exactamente la dosis óptima. En principio, era de esperar que ésta se encontrara alrededor de la correspondiente a una supervivencia del 1 al 10% (ALIKHANYAN, 1971), lo que significa en este caso una dosis entre 35 y 65 erg cm^{-2} (Figura 3). De este modo, se realizó una nueva curva de mutagénesis, pero sembrando esta vez en placas con y sin antifúngicos a las concentraciones de selección para cada uno de ellos. Lo que se pretendía era en esta ocasión el establecer una curva de mutagénesis, y ver a qué dosis era máxima la frecuencia de mutación para cada inhibidor. En la Figura 4 se representa el caso del Benlate, donde se distingue que el

máximo rendimiento puede obtenerse al irradiar con 42 erg cm^{-2} de luz UV, lo que corresponde a una supervivencia del 6%. Dosis inferiores a este valor son insuficientes, y existe un aumento lineal de la frecuencia de mutagénesis al disminuir la supervivencia. Pero valores superiores no sólo no consiguen aumentar el número de resistentes, sino que se aprecia una notable disminución, y ésto es debido a que estamos produciendo al mismo tiempo otras mutaciones letales en la célula, ya que las dosis son demasiado elevadas a partir de este punto.

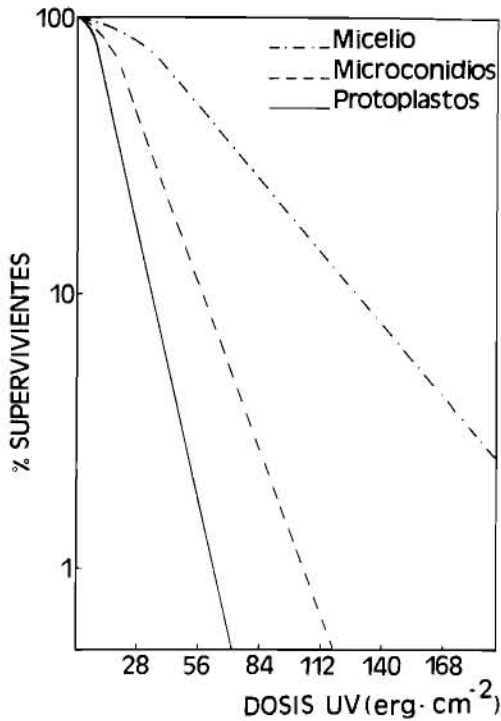


FIGURA 3.—CURVAS DE SUPERVIVENCIA A LA LUZ UV de micelio, microconidios y protoplastos de *P. anserina*.

Con todos estos datos, se pasó ya al aislamiento directo de mutantes resistentes para cada uno de los antifúngicos ya citados, consiguiéndose una colección de cepas útiles para estudios de genética fúngica, debido sobre todo a su fácil selecciona-

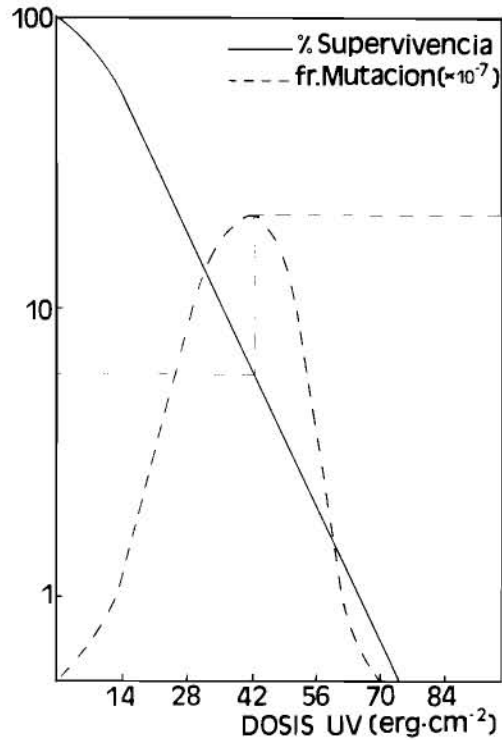


FIGURA 4.—FRECUENCIA DE APARICION DE LA RESISTENCIA AL BENLATE (0,5 µg/ml) al irradiar protoplastos de *P. anserina* con luz UV.

bilidad. Hay que destacar sin embargo que no se han podido aislar hasta el presente mutantes resistentes a 5 µg/ml de Imazalil a partir de protoplastos, con lo que hemos tenido que recurrir a aislarlos desde micelio mutagenizado directamente.

En la actualidad, se están realizando experiencias de fusión celular somática y transformación, utilizando protoplastos de distintas cepas resistentes a estos inhibidores para determinar el grado de dominancia, dosis génica y posible utilización como marcadores de clonación en el plásmido que posee *Podospira anserina*.

BIBLIOGRAFIA

- ALIKHANYAN, S. I. (1971). Selection of wine yeasts using mutagens. *Sov. Genet.* 7: 1200-1205.
 COPPIN-RAYNAL, E. (1977). Ribosomal suppressors and antisuppressors in *Podospira anserina*: resistance to cycloheximide. *J. Bacteriol.* 131: 876-883.

- ESSER, K. (1974). *Podospora anserina*. In *Handbook of Genetics*. (King, R.C., ed.): 531-551. New York. Plenum Press.
- FERRER, S., ALONSO, E. y VICENTE, E. (1982). Efecto mutagénico de la radiación ultravioleta y agentes alquilantes sobre diferentes especies del género *Penicillium*. *Collect. Bot.*, 13: 445-459.
- RAMÓN, D. (1983). *Mejora de las condiciones de manipulación del ascomycete Podospora anserina*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia.
- STAHL, U., LEMKE, P.A., TUDZYNSKI, P., KÜCK, U. y ESSER, K. (1978). Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.*, 162: 341-343.
- VAN TUYL, J.M. (1977). Resistance to systemic fungicides. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, 77-2.