

Comunicación

Caracterización de las proteínas desnaturalizadas de *Septoria tritici* Rob. Ex Desm. por electroforesis en geles de poliacrilamida

Perelló A*; MC Gianibelli**; C Cordo*; HE Alippi* y HO Arriaga**

*Cátedra de Fitopatología y ** Cerealcultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, C.C. 31, 1900, La Plata, Argentina. Comisión de Investigaciones Científicas de Bs.As. (CIC).

Recibido 14 de Abril de 1992; aceptado 23 de Septiembre de 1992

Palabras claves: *Septoria tritici*, trigo, diversidad intraespecífica, tipos culturales, variabilidad, SDS-PAGE.

INTRODUCCION

La población de *Septoria tritici* de la Argentina presenta un alto nivel de variabilidad, reflejado en las diferencias culturales y la virulencia, expuestos en estudios anteriores (Cordo y Linquist, 1987; Cordo y Arriaga, 1987; Cordo et al., 1992a; Perelló et al., 1987, 1990a, 1990b, 1991). Basándose en los patrones de patogenicidad producidos sobre líneas de hospedantes con diferente germoplasma, y según los diferentes tipos morfoculturales ya caracterizados (Cordo et al., 1992a; Perelló et al., 1990a, 1991), la población de aislamientos de *Septoria tritici* puede subdividirse en subpoblaciones o "tipos". Cada una de estas subpoblaciones estarían formadas, presumiblemente, por razas o biotipos relacionados entre sí. La marcada diferencia en la estructura de la población de *Septoria tritici* en la Argentina, la hace de interés para examinarla electroforéticamente a nivel proteico. La electroforesis de proteínas e isoenzimas es ampliamente utilizada por su efectividad, particularmente en los estudios de variabilidad intraespecífica en plantas (Kephart, 1990). Si bien para esta finalidad el estudio del ADN está en expansión, los relacionados con proteínas

son sumamente útiles ya que representan el producto directo de la transcripción y traducción del ADN y son componentes estructurales y enzimáticos de la célula (Micales et al., 1986; Kephart, 1990). La electroforesis de proteínas obtenidas de micelios de hongos fitopatógenos ha sido utilizada en la clasificación e identificación de numerosas especies fúngicas y en taxa inferiores a la especie (Clare, 1963; Striper, 1965; Macko et al., 1967; Faris et al., 1986; Bielenin et al., 1988)

En el género *Phytophthora* (*P. cryptogea*, *P. dreschleri* y *P. syringae*) el análisis de proteínas nativas y desnaturalizadas permitió reconocer subgrupos dentro de cada una de las especies (Bielenin et al., 1988). También en *P. megasperma*, con proteínas desnaturalizadas, se observó variación intraespecífica y se correlacionó dicha variación con diferencias en la morfología y virulencia (Faris et al., 1986; Irwin y Dale, 1982).

Durbin (1966) en el género *Septoria*, empleó proteínas solubles para diferenciar tres especies (*S. tritici*, *S. avenae* y *S. nodorum*). McDonald y Martínez (1990 a y b) utilizaron la técnica de polimorfismo de fragmentos de restricción de ADN (RFLP) para estudiar la variabilidad genética de

MATERIALES Y METODOS

una población de aislamientos de *S. tritici*.

En el país la caracterización electroforética de aislamientos de *S. tritici* no ha sido investigada aún. De allí que el presente estudio se condujo para determinar la existencia de diferencias cuali y/o cuantitativas en las proteínas desnaturalizadas de una población de aislamientos de *S. tritici*.

En todos los casos, los cultivos fueron obtenidos por aislamiento directo desde hojas de plantas de trigo con síntomas típicos de la enfermedad, colectadas a campo. La designación original del cultivo, hospedante o fuente, y origen geográfico de los aislamientos empleados en este estudio, se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Designación original del cultivo, origen geográfico y hospedante o fuente de los aislamientos de *S. tritici* estudiados.
Culture designation, geographic origin and host of source of the isolates of *S. tritici* studied.

Designación	Localidad de Procedencia	Fuente de Origen
21 B	Barrow	Bobwhite "S" 2165 x O -188(F7)
LH5	Los Hornos	Línea de crianza no identificada
M _{ap}	La Plata	Buck Poncho
1191	Barrow	Bobwhite "S" 2274xO-3-88 (Kz)
5 E	La Estanzuela (Uruguay)	Millalew desc. Kavkaz:(Kz)
P ₃	Pergamino	LPI/ Bobwhite "S"
D.E. INTA	Necochea	Bobwhite "S" CM 33203
P ₄	Barrow	Buck Napostá
18 E	La Estanzuela (Uruguay)	Don Ernesto INTA (Bobwhite "S")
38 N	Cronel Dorrego	LP 38388 (Buck Napostá)
23	Miramar	Retacón INTA
1095	La Estanzuela (Uruguay)	Bobwhite "S"
10 B	Barrow	Bobwhite "S" / Genaro

Los aislamientos fueron obtenidos en una cámara fría (4°C) en tubos pico de flauta con agar malta (extracto de malta, 30g; peptonas micológicas, 5g; levaduras, 2g; agar, 20g y agua destilada 1000 ml) hasta el momento de su empleo. A cada tubo se agregó 5 ml de agua destilada estéril, se homogeneizó con un ansa y se vertieron 3 ml de la suspensión en erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 100ml del medio líquido Czapek Dox (NO₃Na 3g, PO₄H₂K 1g, SO₄Mg 0,5g, ClK 0,5g, SO₄Fe 0,01g, sacarosa 30g, y agua destilada 1000ml). Se incubaron 3 erlenmeyers/muestra en cámara de cría a 20 ± 2 °C y con ciclos alternantes de 12 horas luz-oscuridad con el agregado de luz cercana al ultravioleta en el período luminoso. Luego de 20 días, la masa micelial producida se filtró a través de muselina y se lavó con abundante agua destilada. Las muestras pesadas se conservaron a -20°C hasta el momento de su empleo.

Cada extracto micelial, previamente pesado, fue mezclado en un mortero (relación 1:1) con una solución buffer 0,062 M de Tris (hidroximetilaminometano) pH 6,8, 2 % de dodecil sulfato de sodio (SDS), 5 % de mercaptoetanol, 10 % de glicerol y 0,1 % de azul de bromofenol, como marcador del frente de corrida. Los extractos se calentaron a 100°C durante 3 minutos (Laemmli, 1970); posteriormente se centrifugaron 2 veces a 10.000 rpm durante 10min. Los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta la realización de la corrida electroforética.

La electroforesis se llevó a cabo en una cuba para placas verticales (180 x 160 mm). La concentración de acrilamida del gel separador fue del 13 % y 1 % de N,N' metilén bis-acrilamida (bis) y 3 % de acrilamida y 0,043 % de bis-acrilamida en el gel concentrador. La corrida tuvo una duración de 18h a una corriente constante de 15 mA por placa.

La coloración de los geles se realizó de acuerdo con la técnica de Fairbanks et al. (1971)

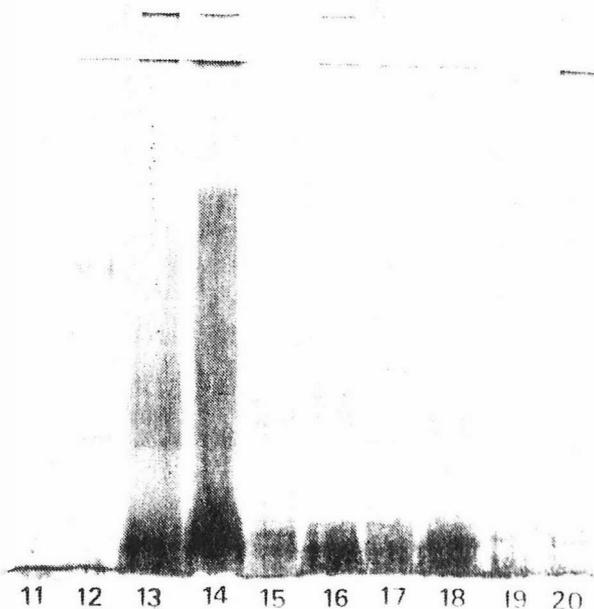
RESULTADOS

Se halló una elevada variación intra-específica entre los patrones de proteínas desnaturalizadas de los distintos aislamientos. (Fig. 1 y Fig 2).

Se visualizaron diferencias entre los patrones de los distintos aislamientos, aunque no todos brindaron bandas suficientemente nítidas para su análisis. En aquellos que aportaron bandas claras y distinguibles, se observó que cada uno presentó un patrón particular y único. Se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas. Los aislamientos P₃, 23 y 1095 revelaron la presencia de unas pocas bandas proteicas (2 a 5) pero ubicadas claramente en distinta posición. (Fig. 1 y Fig. 2)

Figura 1

Figura 1: Patrones Electroforéticos de proteínas desnaturalizadas (SDS-PAGE) de los aislamientos de *S. tritici*.



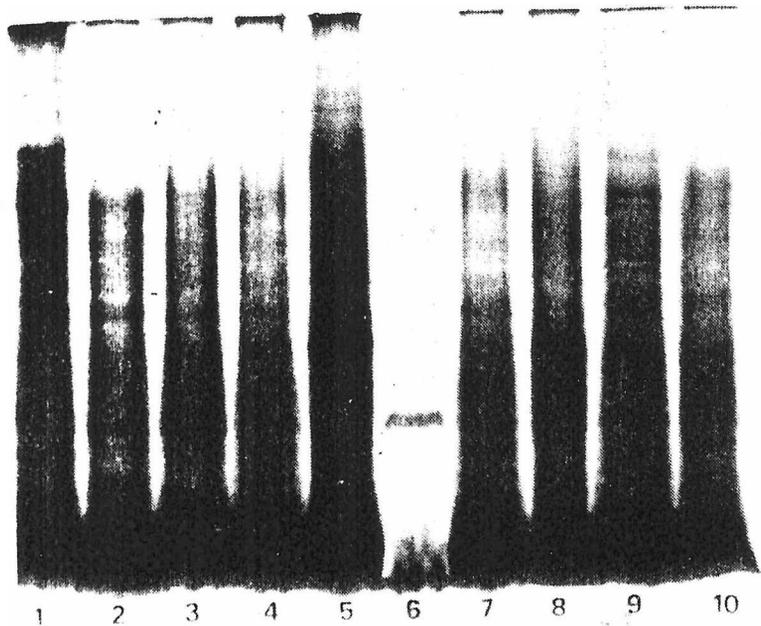


Figura 1: Patrones Electroforéticos de proteínas desnaturalizadas (SDS-PAGE) de los aislamientos de *S. tritici*: 1: 21B, 2: LH₅, 3: M₉₉, 4: 1191, 5: 5E, 6: P₃, 7: D.E. INTA, 8: P₆, 9: 18E, 10: 38N, 11: 23, 12: 1095, 13: 10B, 14: 33B, 15: P₁, 16: 108, 17: 14B, 18: 2, 19: B18, 20: 1/91B.

Protein patterns of isolated of *S. tritici*: 1: 21B, 2: LH₅, 3: M₉₉, 4: 1191, 5: 5E, 6: P₃, 7: D.E. INTA, 8: P₆, 9: 18E, 10: 38N, 11: 23, 12: 1095, 13: 10B, 14: 33B, 15: P₁, 16: 108, 17: 14B, 18: 2, 19: B18, 20: 1/91B.

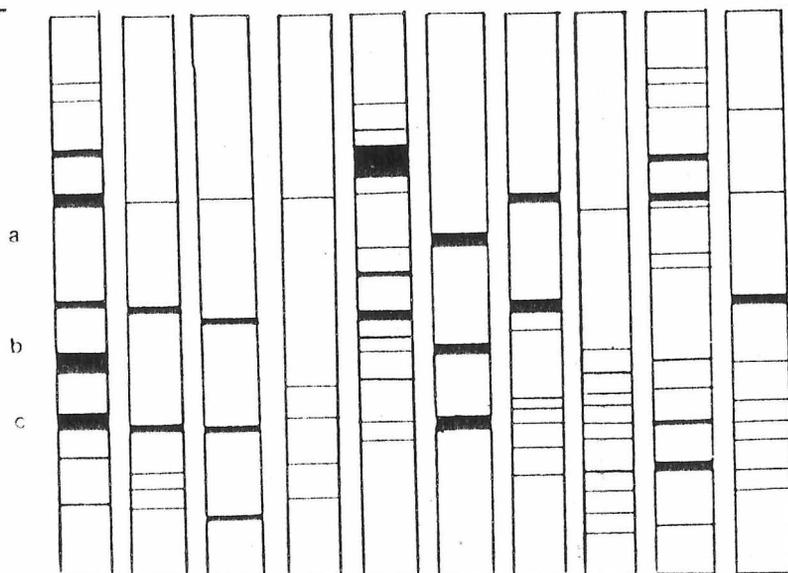


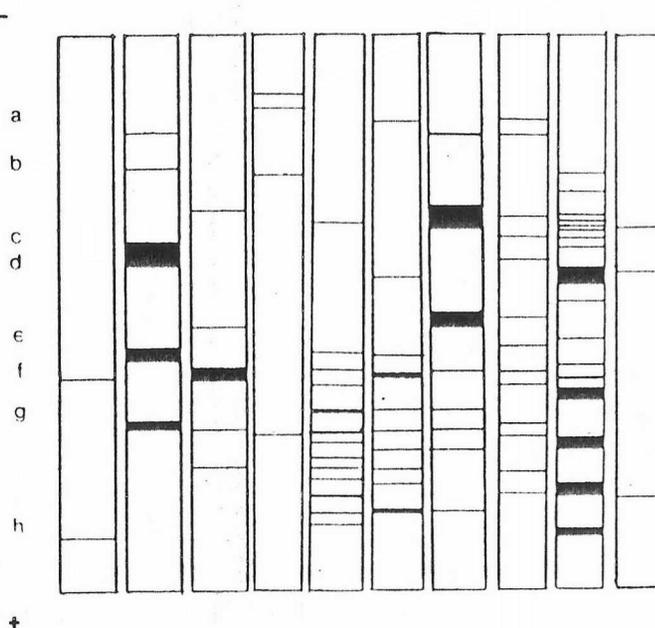
Figura 2: Representación diagramática de las principales bandas de proteínas desnaturalizadas (SDS-PAGE) de los aislamientos de *S. tritici*: 1: 21B, 2: LH₅, 3: M₉₉, 4: 1191, 5: 5E, 6: P₃, 7: D.E. INTA, 8: P₆, 9: 18E, 10: 38N, 11: 23, 12: 1095, 13: 10B, 14: 33B, 15: P₁, 16: 108, 17: 14B, 18: 2, 19: B18, 20: 1/91B.

Diagrammatic representation of the major banding proteins of isolated of *S. tritici*: 1: 21B, 2: LH₅, 3: M₉₉, 4: 1191, 5: 5E, 6: P₃, 7: D.E. INTA, 8: P₆, 9: 18E, 10: 38N, 11: 23, 12: 1095, 13: 10B, 14: 33B, 15: P₁, 16: 108, 17: 14B, 18: 2, 19: B18, 20: 1/91B.

Figura 2: Representación

diagramática de las principales bandas de proteínas desnaturalizadas (SDS-PAGE) de los aislamientos de *S. tritici*: 1:21B, 2:LH₅, 3:M₉₀, 4:1191, 5:5E, 6:P₃, 7:D.E.INTA, 8:P₆, 9:18E, 10:38N, 11:23, 12:1095, 13:10B, 14:33B, 15:P₁, 16:108, 17:14B, 18:2, 19:B18, 20:1/91B.

Diagrammatic representation of the major banding proteins of isolated of *S. tritici*: 1:21B, 2:LH₅, 3:M₉₀, 4:1191, 5:5E, 6:P₃, 7:D.E.INTA, 8:P₆, 9:18E, 10:38N, 11:23, 12:1095, 13:10B, 14:33B, 15:P₁, 16:108, 17:14B, 18:2, 19:B18, 20:1/91B.



Los aislamientos B₁₈, 5E, P₁ y 108 N también se distinguieron por presentar bandas diferentes del resto.

Los aislamientos caracterizados electroforéticamente, respondieron a los tipos culturales levaduroides y albinos (en sus formas pulverulentas yesoso y aterciopelado "tipo cordeé").

Las distintas variantes morfo culturales comprendieron una serie diferente de estructuras del talo: desde el talo levaduroide con células brotantes (P₃), continuando por el talo miceliar constituido por pseudomicelio con células terminales brotantes (P₁, LH₅m), también por el talo miceliar con hifas verdaderas y abundancia de conidios (1095, 23, 108 y 35 B), para finalizar con el estroma albino sin picnidios (5 E).

Cada estructura celular (células brotantes o conidios) fue infectiva cuando se la inoculó sobre trigo, ya que reprodujo la lesión típica y con picnidios, pero se hallaron diferencias en la virulencia (Cordo et al., 1992a; Perelló et al., 1990b).

La gran variación en virulencia y caracterís-

ticas morfo culturales de los aislamientos también se vió reflejada en el alto nivel de diversidad electroforética encontrada. Sin embargo, estos tres caracteres no parecían estar asociados, como se observa, por ejemplo: con los aislamientos 23 y B18, en los que el tipo cultural y el patrón de bandas electroforéticas es distinto, y la virulencia es alta en ambos aislamientos (Tabla 2).

DISCUSION

El reconocimiento de diferenciación intraespecífica de *S. tritici*, se basa en pruebas de patogenicidad sobre un "set" de hospedante diferenciales, y en las características morfo culturales "in vitro". Así, fue posible establecer en el país la existencia de un alto grado de variabilidad en dichos caracteres.

El análisis de patrones de proteínas nativas y desnaturalizadas de hongos fitopatógenos ha sido usada con frecuencia para diferenciaciones inter e intra específicas (Micales et al., 1986; Clare, 1963; Stripper, 1965; Macko et al., 1967; Bielenin et



Figura 3



Figura 3: Colonias de *S. tritici* de 20 días de desarrollo en AM (agar malta). Los aislamientos 2091, 27, M₁₈, 3B y 30 no fueron incluidos en el análisis de proteínas por la poca cantidad de extracto micelar obtenido.

Tipos culturales: levaduroide : P₃, 23, 1095, 1191, 2091, 33B, y 1/91; albino: 5E, P₁, LH₅, 14B, 10B, 18E, 3B; típico estromático con picnidios: B18, 108, 6 y micelar: M₁₈, 3B, 2, 21B, 30, 27.

20 days old cultures of *S. tritici* in Malt Agar (MA). The isolates 2091, 27, M₁₈, 3B and 30 were not included in the protein analysis. Cultural types: yeast-like : P₃, 23, 1095, 1191, 2091, 33B, y 1/91; albino : 5E, P₁, LH₅, 14B, 10B, 18E, 3B; typical stromatic with picnidia : B18, 108, 6 y micelial: M₁₈, 3B, 2, 21B, 30, 27.

Tabla 2: tipo cultural, virulencia y patrones de bandas proteicas de algunos aislamientos de *S. tritici*.
Cultural type, virulence and protein patterns of some *S. tritici* isolates

Aislamientos	Tipo cultural	Virulencia	Patrón proteico
P ₃	mucoso levaduroide c.brotantes cilíndricas	baja	3 bandas (a,b,c)
23	mucoso levaduroide conidios secundarios	alta	2 bandas (f,h)
1095	mucoso levaduroide conidios secundarios	no caracterizada	5 bandas (a,b,c,e,g)
B 18	típicos picnidios con picnidiosporas	alta	muchas bandas, una (b) distinguible del resto
P ₁	albino, miceliar, yesoso. células brotantes elípticas	baja	muchas bandas ubicadas en posición diferente del resto de los aislamientos
108	típicos picnidios con picnidiospora	no caracterizada	idem P ₁
5 E	albino, pulvurulento yesoso, conidios secundarios	baja	idem P ₁ y 108
LH5	albino, miceliar, yesoso	baja	bandas similares a M ₈₉ , 1191 y 38 N.

* No se mencionan algunos aislamientos analizados por su baja resolución electroforética.

al., 1988; Hamm y Hansen, 1983). Con respecto al género *Septoria*, Durbin (1966) halló patrones idénticos o muy similares con pequeñas variaciones en la posición de las bandas, al analizar las proteínas solubles de tres especies de este género. McDonald y Martínez (1990a y b) hallaron un alto nivel de polimorfismo entre aislamientos de *S. tritici*, aún provenientes de la misma hoja y la misma lesión, con el empleo de la técnica de polimorfismo de fragmentos de restricción de ADN.

Los resultados aquí obtenidos con proteínas desnaturalizadas muestran un elevado polimorfismo con gran variación en el número y posición de las bandas. Estos estudios bioquímicos preliminares, sobre la población local de aislamientos de patógenos, proveen una evidencia adicional de su alto grado de variabilidad.

En *Puccinia graminis* la investigación conjunta de electroforesis de proteínas y virulencia, aportó una nueva prueba de la importancia del proceso sexual en el mantenimiento de la variación

(Burdon y Roefels, 1985). En *S. tritici*, la existencia del proceso sexual en la población de aislamientos de la zona, aumentaría la posibilidad de recombinación genética, asegurando la ocurrencia de una considerable diversidad de genotipos, expresada en la gran variabilidad observada.

El análisis de un mayor número de marcadores genéticos (isoenzimas y ADN) contribuirá a lograr una mayor comprensión de la magnitud y distribución de la variación que existe en este organismo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. C. Añón (CIDCA) por sus sugerencias al iniciar este estudio, al Dpto. de Virología, Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP, por facilitar su laboratorio y a CAFPTA por subsidiar el presente proyecto de investigación.

BIBLIOGRAFIA

- Bienlein A, SN Jeffers, WF Wilcox and AL Jones (1988) Separation by protein electrophoresis of six species of *Phytophthora* associated with deciduous fruit crops. *Phytopathology* 78 (11) : 1402-1408
- Burdon JJ and AP Roefels (1985) The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, 75 (9) : 1068-1073
- Clare RG (1963) Starch-gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. *Nature*, London 200: 803-804
- Cordo C y JC Lindquist (1987) Análisis cualitativo de la variabilidad cultural de *Septoria tritici*. *Bol Soc Arg Botánica* 25 (1-2) : 59-77 pág
- Cordo C y HO Arriaga (1987) Variación en patogenicidad entre cepas argentinas de *Septoria tritici*. Conferencia Regional sobre la *Septoria* del trigo. D F : CIMMYT pág 84-96
- Cordo C, A Perelló, HE Allipi y HO Arriaga (1992a) Bobwhite "S" germoplasm selection pressure upon *Septoria tritici* pathogenicity. Symposium of durability of disease resistance, february 24-28, IAC, Wageningen, The Netherland (Proceedings, in press)
- Cordo C, A Perelló, HE Allipi y HO Arriaga (1992b) Presencia de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter, teleomorfo de *Septoria tritici* Rob apud Desm. en trigos maduros de la Argentina. (Enviado para su publicación)
- Durbin RD (1966) Comparative gel-electrophoretic investigation of the protein patterns of *Septoria* species. *Nature*, London 210:1186-1187
- Fairbanks G, TL Steck and DF Wallach (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 18: 3606
- Farris MA, FE Sisto and Y Cloutier (1986) Intra-specific variation in gel electrophoresis patterns of soluble mycelial proteins of *Phytophthora megasperma* isolated from alfalfa. *Can J Bot* 64: 262-265

- Hamm PB and EM Hansen (1983) *Phytophthora pseudotsugae*, a new species causing root rot of Douglas-fir. Can J Bot 61: 2626-2631.
- Irwin JAG and JL Dale (1982) Relationships between *Phytophthora magasperma* isolates from chickpea, lucerne, and soybean. Aust J Bot 30:199-210.
- Kephard S (1990) Starch gel electrophoresis of plant isozymes. A comparative analysis of techniques. Amer J Bot 77: 693-712.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London 227: 680-685.
- Macko V, A Novachy and MA Slahmann (1967) Protein and enzyme patterns from uredosporas of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Phytopathol Z 58: 122-127.
- McDonald BA and JP Martínez (1990a) DNA Restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. Phytopathology 80 (12): 1368-1372.
- McDonald BA and JP Martínez (1990b) Restriction fragment length polymorphisms in *Septoria tritici* occur at a high frequency. Curr Genet 17:133-138.
- Micales JA, MR Bonde and GL Peterson (1986) The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. Micotaxon (27) 405-449.
- Perelló A, F Babinec y C Cordero (1987) Especialización fisiológica en cepas argentinas de *Septoria tritici* Rob. ex Desm. (teleomorfo *Mycosphaerella graminicola*) (Fuckel) Schroeter. Conferencia Regional sobre la septoriosis del Trigo. México D.F.: CIMMYT/MAO/PO pp 101-107.
- Perelló A, C Cordero, HE Alippi (1990a) Características morfológicas y patológicas de aislamientos de *Septoria tritici* Rob. ex Desm. Agronomía 10.: 641-648.
- Perelló A, C Cordero, HE Alippi (1990b) Influencia de las fuentes carbonadas y nitrogenadas en el crecimiento de *Septoria tritici* Rob. ex Desm. II Congreso Nacional de Trigo, 17-19 de octubre de 1990.
- Perelló A, C Cordero, HE Alippi y HO Arriaga (1991) Variation in virulence of *Septoria tritici* Rob. ex Desm. Agronomía 11: 571-579.
- Stripes RJ (1967) Disc electrophoresis of micellar proteins from *Ceratocystis* species. Phytopathology 57: 833 (abstract).