

Tesis de Posgrado

Caracterización molecular de la relación hospedante-patógeno en el sistema trigo-roya de la hoja

Heinz, Ruth Amelia

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Heinz, Ruth Amelia. (1991). Caracterización molecular de la relación hospedante-patógeno en el sistema trigo-roya de la hoja. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2457_Heinz.pdf

Cita tipo Chicago:

Heinz, Ruth Amelia. "Caracterización molecular de la relación hospedante-patógeno en el sistema trigo-roya de la hoja". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2457_Heinz.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TEMA DE TESIS

**Caracterización molecular de la relación
hospedante-patógeno en el sistema trigo-roya de la hoja**

AUTOR

Ruth Amelia Heinz

DIRECTOR DE TESIS

Dr. H. Esteban Hopp

LUGAR DE TRABAJO

**Instituto de Genética e
Instituto de Biología Molecular
INTA Castelar**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Biología**

1991

*Tesis.
2457.
E. S.*

A Carlos, por haberme acompañado y alentado
durante todo este tiempo de trabajo

Agradecimientos:

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que de una u otra forma han contribuido a la realización del presente trabajo.

Muy especialmente al Dr. Esteban Hopp, a quien debo mi formación en el área molecular, por la dirección de este trabajo y por el apoyo y estímulo recibido en todo momento.

Al Ing. Ewald Favret por la oportunidad de realizar este trabajo en el Instituto de Genética y por su permanente apoyo y críticas al mismo.

Al Dr. Eduardo Palma por haberme permitido desarrollar la mayor parte de este trabajo en el Instituto de Biología Molecular que él dirige.

A todos los integrantes del Instituto de Genética, especialmente a los Ing. Francisco Sacco y Hector Saione, por la multiplicación del material biológico y al Ing. Agr. Enrique Suárez por sus enriquecedores aportes a este trabajo.

A mis compañeros del Instituto de Biología Molecular por haber permitido que este trabajo se realizara en un ámbito cordial y de mutuo apoyo.

A mis compañeras de mesada Mariana y Laura, por la activa participación y colaboración en este trabajo.

A Alejandro Escandón, compañero desde mis inicios en Biología Molecular, por su constante apoyo.

A mis padres por el apoyo que siempre me han brindado.

A Carlos por el infinito estímulo, comprensión y paciencia

Pocos ejemplos hay en la historia más claros de que no basta la agudeza intelectual para descubrir una cosa nueva. Hace falta entusiasmo, amor previo por esa cosa. El entendimiento es una linterna que necesita ir dirigida por una mano, y la mano necesita ir movilizada por un afán preexistente hacia este o el otro tipo de posibles cosas. En definitiva solo se encuentra lo que se busca y el entendimiento encuentra gracias a que el amor busca.

José Ortega y Gasset

ABREVIATURAS:

DEP	Dietilpirocarbamato
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
H-P	Hospedante-patógeno
kDa	kilodalton
Met	Metionina
MOPS	Acido 3-N-Morfolinopropanosulfónico
PPO	2,5-difeniloxazol
PR	Proteína relacionada con la patogénesis
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N' tetrametilendiamina
TI	tipo de infección
T.E.	Tris 10mM; EDTA 1mM
PIPES	piperazine-N y N'-bis (a-ethane-sulfonic acid)
BSA	Seroalbuminabovina
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.
IPTG	isopropylhico- β -D-galactoside
X-Gal	5-bromo-4-choro-3 indolyl- β -D-galactoside
LB	medio de Luria-Bertani
PAES	Polyanetholesulfonic acid
cpm	cuentas por minuto
p.f.u.	unidad formadora de placas de lisis
PPi	pirofosfato
cDNA	DNA copia
mRNA	RNA mensajero
Met	metionina
pb	pares de bases
PM	peso molecular

INDICE

INTRODUCCION	1
1. Enfermedades causadas por patógenos específicos.....	1
Especificidad fisiológica de las royas.....	3
2. Interacciones hospedante-patógeno específicas vs. interacciones inespecíficas.....	3
2.1. Interacción no específica.....	3
2.2. Interacción específica y genética interorganismica.....	4
3. Genética de la relación hospedante-patógeno en interacciones específicas.....	7
3.1. Modelo de Flor.....	7
3.2. Modelo de Favret.....	9
4. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la relación hospedante-patógeno.....	10
4.1. Roya de la hoja.....	10
4.2. Proceso de penetración de la roya de la hoja.....	11
4.3. Reacción hipersensible. Inhibición del crecimiento del hongo.....	13
4.3.1. Inhibición temprana del desarrollo del hongo.....	13
4.3.2. Expresión tardía de la incompatibilidad.....	14
4.4. Mecanismos de defensa frente a la infección por patógenos.....	15
4.4.1. Productos del metabolismo secundario.....	16
a) Fitoalexinas	16
b) Lignificación.....	17
4.4.2. Modificaciones de la pared celular (excluyendo lignificación).....	18
4.4.3. Enzimas hidrolíticas.....	19
4.4.3.1. Quitinasa y lisozima.....	19
4.4.3.2. β -1,3-glucanasa.....	21
4.4.3.3. Otras hidrolasas.. ..	22
Celulasa.....	22
Glicosidasa.....	22
α Manosidasa y β -N acetil glucosaminidasa.....	22
Proteinasa.....	22
Ribonucleasa.....	22
Fosfatasa.....	22
4.4.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).....	22
4.4.5. Inhibidores de proteasas.....	24
4.4.6. Inducción de enzimas de defensa. Desencadenantes y receptores.....	24
4.5. Mecanismos de virulencia conocidos en patógenos	26
4.5.1. Detoxificación.....	26
4.5.2. Producción de toxinas.....	26
5. Organización génica de segmentos isofénicos en cereales.....	28
5.1. Localización cromosómica de genes de reacción a roya.....	28
5.2. Localización de genes que codifican para proteínas de reserva.....	29

proteínas de reserva.....	29
5.3. Utilización de genes de proteínas como marcadores de genes de reacción a roya.....	30
6. Biología molecular de la relación hospedante-patógeno.....	31
6.1. Modelos moleculares de reconocimiento hospedante-patógeno.....	31
6.1.1. Compatibilidad específica vs incompatibilidad específica.....	31
6.1.2. Modelo de compatibilidad básica en interacciones hospedante-patógeno.....	33
6.1.3. Etapas de reconocimiento entre hospedante y patógeno. Modelo de complementación....	34
6.2. Evidencias de cambios moleculares en interacciones hospedante-patógeno específicas...	37
Objetivos.....	40
MATERIALES Y METODOS.....	42
1. Material biológico.....	43
2. Reactivos químicos.....	45
Parte Experimental.....	47
3. Condiciones de crecimiento de las plantas e inoculación de plántulas.....	47
4. Análisis de cambios proteicos	47
4.1. Sistemas de marcación de hojas "in vivo".....	47
4.1.1. Marcación a través de raíz.....	47
4.1.2. Marcación a través de vaina.....	48
4.2. Procesamiento de muestras. Fraccionamiento.....	51
4.3. Medición de radiactividad incorporada.....	52
4.4. Electroforesis de proteínas.....	53
4.4.1. Método de Chua y Bennoun.....	53
4.4.2. Método de Altman.....	53
4.5. Tratamiento para fluorografía.....	54
4.5.1. Tratamiento con salicilato de sodio..	
4.5.2. Tratamiento con PPO-DMSO.....	54
4.6. Extracción e identificación de proteínas ácidas.....	55
5. Análisis de cambios a nivel de RNA.....	56
5.1. Extracción de RNA.....	56
5.2. Electroforesis de RNA.....	56
5.3. Traducción de RNA mensajero.....	57
5.4. Electroforesis de proteínas sintetizadas "in vitro".....	54
6. Análisis de la organización génica.....	58
6.1. Extracción y electroforesis de proteínas de reserva.....	58
6.2. Extracción y purificación de DNA.....	58
6.3. Restricción con endonucleasas y Southern blot..	59
6.4. Extracción de plásmidos y preparación de sonda.....	60
6.5. Hibridación, exposición y revelado.....	62
7. Construcción de colecciones de cDNA en lambda gt10....	62
7.1. Aislamiento de RNA mensajero a partir de RNA total.....	62
7.2. Síntesis de cDNA doble cadena a partir de mRNA..	63

7.3.	Electroforesis en gel alcalino.....	64
7.4.	Fraccionamiento del cDNA.....	65
7.5.	Cuantificación del cDNA doble cadena obtenido...	65
7.6.	Clonado del cDNA.....	66
8.	Construcción de una colección de cDNA diferencial.....	67
8.1.	Fotobiotinilación.....	68
8.2.	Síntesis de cDNA 1º cadena de Gamma 1R-FO ₁	
8.3.	Hibridación sustractiva.....	69
8.4.	Síntesis de cDNA 2º cadena.....	69
8.5.	Clonado de cDNA diferencial.....	69
8.5.1.	Adición de adaptadores.....	69
8.5.2.	Selección del cDNA por tamaño.....	70
8.5.3.	Ligada del cDNA al vector pcDNA II.....	70
8.5.4.	Transformación.....	71
9.	Identificación de clones diferenciales.....	71
9.1.	Minipreparación de plásmidos.....	73
9.2.	Preparación de plásmidos a gran escala.....	73
9.3.	Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos obtenidos.....	73
9.4.	Electroforesis en geles de agarosa.....	74
RESULTADOS.....		76
1.	Determinación del momento óptimo de inoculación.....	76
2.	Evaluación del grado de reacción y sintomatología...	76
3.	Proteínas sintetizadas de novo.....	79
3.1.	Comparación de sistemas de marcación de hojas "in vivo".....	80
3.2.	Comparación de sistemas de electroforesis y procesamiento para fluorografía.....	81
3.3	Caracterización de los patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas "in vivo".....	81
3.3.1.	Curva de tiempo del proceso de infección.....	83
3.3.2.	Análisis de la especificidad de bandas polipeptídicas.....	88
3.3.2.1.	Variación en la tasa de síntesis proteica en plantas infectadas.....	88
3.3.2.2.	Patrones electroforéticos de interacciones H-P compatibles e incompatibles al tercer día del proceso de infección.....	91
a)	Incrementos en intensidad de bandas polipeptídicas.....	91
b)	Disminución en intensidad de bandas polipeptídicas diferenciales.....	94
4.	Caracterización de los patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas "in vitro".....	102
4.1.	Curva de tiempo de proteínas sintetizadas "in vitro" en interacciones compatibles en incompatibles.....	102
4.2.	Patrones de traducción de RNAs de diferentes interacciones compatibles e incompatibles.....	107
5.	Proteínas relacionadas con la patogénesis.....	111
6.	Análisis de la organización génica en segmentos isofénicos.....	113

6.1.	Análisis de gliadinas y glutelinas.....	113
6.2	Análisis de rearrreglos a nivel de DNA.....	116
7.	Construcción de colecciones de cDNA.....	119
8.	7.1. Clonado en lambda gt10	
	7.1.1. Síntesis y fraccionamiento de cDNA.....	119
	7.1.2. Análisis de la colección de cDNA.....	122
	7.2. Construcción de una colección de cDNA diferenciales.....	122
	7.2.1. Hibridación sustractiva.....	123
	7.2.2. Transformación.....	124
	7.2.3. Identificación de clones de cDNA diferencial.....	124
	DISCUSION.....	133
1.	Sistema trigo-roya de la hoja como modelo de interacciones altamente específicas.....	134
2.	Síntesis de polipéptidos relacionados con la reacción a patógenos.....	135
3.	Transcripción de RNA mensajeros en hojas inoculadas con roya.....	138
4.	Dirección de los cambios polipeptídicos y de RNAs específicos	141
5.	Clonado de cDNA diferenciales inducidos en una interacción compatible.....	142
	CONCLUSIONES.....	145
	BIBLIOGRAFIA.....	148
	RESUMEN.....	163

INTRODUCCION

1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PATOGENOS ESPECIFICOS

Es conocido que las enfermedades afectan tanto el rendimiento como la calidad de productos de cosecha. Entre las enfermedades que ocasionan mayores pérdidas en cereales como el trigo, agravadas en mayor o menor medida por las condiciones climáticas imperantes (humedad y temperatura), figuran las royas.

Muchas de las enfermedades que ocasionan, en forma regular, pérdidas de rendimiento y disminución de la calidad en las especies cultivadas, pueden en mayor o menor grado, ser controladas por biocidas. En particular las royas constituyen uno de los tipos de patógenos de más difícil control siendo necesaria la utilización de productos sistémicos que aumentan los costos de producción significativamente. Debido a esto, no hay dudas que la forma más eficiente de evitar pérdidas provocadas por fitoparásitos, consiste en la siembra de genotipos resistentes a los mismos. Sin embargo hay que tener en cuenta que patógenos como las royas que presentan una alta capacidad de generación de nuevas formas por mutación, virulentas sobre variedades antes resistentes, hacen más difícil el control. La obtención de variedades resistentes por métodos de mejoramiento clásicos se enfrenta también con otras limitaciones como por ejemplo la introducción, en variedades agrónomicamente importantes, de genes indeseables ligados a los de interés o el número de generaciones necesarias para la fijación de caracteres.

La caracterización molecular de los productos intervinientes en la reacción a patógenos altamente específicos como las royas es el primer paso para entender el mecanismo de interacción hospedante-patógeno en este tipo de sistemas y poder determinar la forma y el momento de expresión de los genes intervinientes.

Especificidad fisiológica de las royas

A principios de siglo se demostró (Biffen 1907) la existencia de factores que regulan la resistencia frente a Puccinia glumarum, en trigo y Erysiphe graminis en cebada, que mostraron un patrón hereditario concordante con las leyes de Mendel recientemente redescubiertas. Para esa misma época se detectaron diferentes formas de Puccinia graminis tritici, respecto de su patogenicidad, habiéndose descrito por lo menos 200 variantes fisiológicas (Shaw 1963). La especialización fisiológica de P.recondita tritici fue reportada ya en 1926 por Mains y Jackson.

2. INTERACCIONES HOSPEDANTE-PATOGENO ESPECIFICAS Vs. INTERACCIONES NO ESPECIFICAS

En la actualidad se acepta la existencia de dos tipos diferentes de asociaciones o interacciones posibles entre el organismo hospedante y el patógeno: una considerada específica y otra no específica.

2.1. Interacción no específica:

La interacción no específica es aquella en la cual la reacción del hospedante no está condicionada por el genotipo del patógeno. La interacción más elemental es entonces:

Cuadro 1

PATOGENO

		X	Y
H			
O	A	0	0
S			
P	B	1	1

La resistencia (0) del hospedante A es perdurable en el tiempo, pues el patógeno no tiene posibilidad de producir un genotipo capaz de provocar una reacción compatible (1).

Algunos autores (Ward y Soessel, 1976) definen a este tipo de resistencia no específica, resistencia por "no huesped", considerándola como una resistencia más general desencadenada inespecíficamente por un microorganismo sobre una especie que normalmente no puede considerarse como hospedante. Otros autores (Ouchi, 1976) consideran que la falta de genes de reconocimiento del patógeno (genes para "susceptibilidad) es la causa de esta resistencia generalizada. Esta resistencia es aparentemente efectiva sobre la mayoría de los microorganismos capaces de infectar plantas superiores distinguiéndose de la "resistencia de cultivar" o resistencia específica.

2.2 Interacciones específicas y genética interorganísmica:

Las interacciones de tipo específico fueron demostradas en forma concluyente por Flor en 1942 (Flor, 1942; Flor 1955). Este investigador, trabajando con Linum usitatissimum y Melampsora lini, determinó que la enfermedad "roya del lino" resulta de interacciones entre genes de ambos organismos. La teoría de Flor conocida con el nombre "gen a gen" establece que la resistencia o susceptibilidad de una planta a un hongo

productor de "roya" y la virulencia o avirulencia del mismo con relación a la planta, resulta de la interacción entre el complejo génico nuclear y/o citoplasmático de ambos organismos y que el ambiente actúa en forma individual sobre cada organismo y sobre la interacción que se produce entre los mismos.

Cuando dos variantes fisiológicas de un patógeno causan diferentes reacciones en un mismo huésped, una que produce enfermedad y la otra que no, pueden ser clasificadas como razas diferentes del patógeno, lo que lleva al término resistencia específica de raza. La raza que causa enfermedad se dice que es virulenta sobre el cultivar, mientras que la otra se describe como avirulenta. Desde el punto de vista práctico, la reacción específica es reconocida por la existencia de razas fisiológicas del patógeno. La ausencia de razas fisiológicas, por otro lado, no permite descartar la existencia de variabilidad (en cuanto a resistencia a patógenos) ya que no se puede asegurar que frente a otra variedad de huésped aún no probada, sea posible distinguir dos razas distintas a partir de lo que pensábamos era una sola raza.

Luego de la formulación de esta hipótesis se comprobó que otros sistemas hospedantes-patógenos están determinados por mecanismos genéticos similares.

La siguiente figura adaptada de Loegering (Loegering 1966; Loegering et al 1981) permite visualizar en forma clara un sistema de este tipo:

Cuadro 2

ORGANISMO	Hospedante		Enfermedad		Patógeno	
CARACTER	Reacción		Tipo de infección		Patogenicidad	
FENOTIPO	Resist.	Suscep.	0	1	Avir.	Vir.

Cuando un patógeno (P) desarrolla sobre un hospedante (H) el resultado usualmente es una pústula, una lesión, una mancha, etc, que no son caracteres propios del hospedante o del

patógeno sino de la interacción. Las diferentes peculiaridades que presentan estas pústulas, manchas, etc, permiten que se las pueda clasificar, arbitrariamente, en diferentes tipos de infección (TI) que son indicativas de la mayor o menor gravedad de la enfermedad. El TI, en consecuencia, describe la enfermedad. Un $TI=0$ indica que la asociación entre ambos organismos es incompatible, lo que equivale a decir que el patógeno no puede desarrollar sobre el hospedante, o que lo hace muy pobremente. La interacción entre una raza avirulenta y un huésped resistente es incompatible.

Un $TI=1$ significa que la asociación es compatible y por lo tanto el patógeno puede desarrollar sin obstáculo sobre el hospedante. La interacción entre una raza virulenta y un huésped susceptible se describe como compatible.

Tanto la reacción que es un carácter propio de la planta, como la patogenicidad que lo es del parásito, no pueden ser evaluados en forma directa. Estos caracteres son evaluados a través del TI que es el carácter de la enfermedad.

En la naturaleza ocurre que existen varios pares de genes correspondientes que interaccionan para producir el TI. Estas interacciones fueron clasificadas por Loegering y Powers en cuatro categorías:

a) Involucra dominancia y recesividad entre alelos de un gen para reacción o patogenicidad en el hospedante o el patógeno respectivamente. Ej. avirulencia es generalmente dominante sobre virulencia en el patógeno y resistencia sobre susceptibilidad en el huésped.

b) Involucra efectos genéticos tales como epístasis y complementaridad, las que resultan de interacciones entre genes para reacción o patogenicidad, en diferentes loci en los organismos respectivos.

c) Involucra interacción dentro de cada par de genes correspondientes.

d) Involucra las interacciones entre dos o más pares de genes correspondientes.

Las categorías a) y b) son comunes a la genética clásica y las categorías c) y d) son las que corresponden a lo que se

denomina genética interorganísmica, porque se verifican entre genes de distintos organismos.

En la categoría d) de interacciones el TI=0 de un par de genes correspondientes es epistático sobre el TI=1 de otro u otros genes correspondientes.

Como se puede inferir, el concepto de reacción o patogenicidad en un sistema H-P no depende de ninguno de los organismos por si mismos, sino de la interacción entre genes de ambos organismos.

3. GENETICA DE LA RELACION HOSPEDANTE-PATOGENO EN INTERACCIONES ESPECIFICAS

3.1. Modelo de Flor

La hipótesis básica para la correspondencia de genes del hospedante y genes del patógeno se representa con un modelo que se conoce con la denominación de "quadratic check" postulado por Flor (1942. 1955) en su teoría de relación "gen a gen" anteriormente mencionada. El siguiente cuadro resume dicho modelo:

Cuadro 3

PP		pp
RR	0	1
rr	1	1

Por lo tanto, para cada gen con dos alelos en el hospedante, (uno de ellos, R confiere resistencia [0] y el otro, r susceptibilidad [1]) hay un gen correspondiente también con dos alelos en el patógeno (uno de los cuales, P confiere avirulencia y el otro, p virulencia).

En el cuadro 4 se observa la interacción entre dos genes con dos alelos en el hospedante con dos genes con dos alelos en el patógeno en correspondencia con la teoría de Flor. De aquí el nombre "gen a gen" que tiene la teoría.

Cuadro 4

	PATOGENO			
	ALAL ANAN	ALAL aNaN	aLaL ANAN	aLaL aNaN
LLnn	0	0	1	1
llNN	0	1	0	1

Como se desprende del cuadro, es suficiente la presencia de un gen de resistencia (L o N) en el hospedante interactuando con el correspondiente gen de avirulencia en el patógeno (AL o AN) para que la reacción final sea incompatible (0).

Esta teoría postulada por Flor adolece de ciertas imprecisiones señaladas por Favret (Favret 1969; Favret 1971).

Tomando en cuenta lo siguiente :

Con respecto al huésped: (Favret 1966)

- a) El número de genes es usualmente muy alto.
- b) El número de alelos (o pseudoalelos) para algunos genes es también muy alto. Los loci para resistencia a enfermedades tienen múltiples sitios activos, lo que determina que la posibilidad de ocurrencia de nuevos alelos dominantes por un simple cambio relativo de DNA es mayor en comparación con otros caracteres (Kiyosawa y Namura 1988).

c) Los genes de reacción tienden a estar localizados en segmentos cromosómicos (probablemente formando familias multigénicas) y no estar distribuidos en forma dispersa por el genoma.

Con respecto al patógeno: (Mosseman 1966)

- a) El número de genes es usualmente alto.

b) Las series multialélicas son infrecuentes o posiblemente inexistentes.

c) Los genes están dispersos en el genoma.

Favret señala dos problemas a la hipótesis de Flor:

a) La correspondencia numérica entre genes del patógeno y del huésped requiere de la definición de genes alélicos, y, como consecuencia, la hipótesis se torna tautológica.

b) Si se observa el "quadratic check" se ve que el par de genes correspondientes RR/PP da un TI=0 con lo que se puede concluir que el alelo R da resistencia y el alelo P da avirulencia. Pero cuando se toma el par correspondiente RR/pp R ya no da resistencia sino susceptibilidad, y algo similar ocurre cuando se observa el par rr/PP donde P ya no confiere avirulencia sino virulencia en presencia de un gen de susceptibilidad.

3.2. Modelo de Favret

En base a los puntos contradictorios del modelo de Flor señalados anteriormente, Favret (1969) propuso ciertas modificaciones postulando un modelo de relación hospedante-patógeno que denominó "alelo a gen".

El siguiente cuadro muestra la interacción de un gen con dos alelos en el hospedante con dos genes dialélicos en el patógeno. En este caso la correspondencia es de "un alelo en el hospedante para un gen dialélico en el patógeno".

Cuadro 5

	PATOGENO			
	P ₁ P ₁	P ₁ P ₁	p ₁ p ₁	p ₁ p ₁
	P ₂ P ₂	p ₂ p ₂	P ₂ P ₂	p ₂ p ₂
R ₁ R ₁	0	0	1	1
R ₂ R ₂	0	1	0	1

Además, Favret, considera que es difícil concebir que un huésped posea dos o más alternativas alélicas de un gen como resistencia y susceptibilidad, a menos que se caiga en un razonamiento teleológico: el patógeno no es un factor necesario para el desarrollo del huésped, de manera que es erróneo postular que el huésped tiene alelos para resistencia o susceptibilidad. Por lo tanto propone hablar de alelos de reacción al patógeno en el hospedante y genes de virulencia en el patógeno. Habría genes en el hospedante que regulan algunos aspectos de su metabolismo y que interfieren con el desarrollo del patógeno.

4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA RELACION HOSPEDANTE-PATOGENO.

El estudio de la relación hospedante-patógeno en sistemas altamente específicos como el de trigo-roya de la hoja es conveniente encararlo como interacción de dos organismos y no estudiar ambos organismos en forma individual. Pero con el objeto de entender la forma de infección del patógeno de interés en este trabajo y su distinción de otros patógenos, se describen brevemente a continuación las características más sobresalientes del mismo, su forma de penetración y los mecanismos de defensa que se inducen en el hospedante a causa de la infección. Si bien se particulariza el caso de roya, lo mencionado es válido no solo para este patógeno sino en general para distintos sistemas que incluyen diversos hospedantes y patógenos, así como los mecanismos de virulencia conocidos en algunos de estos patógenos.

4.1 Roya de la hoja

La roya de la hoja, Puccinia recondita f.sp. tritici fue descrita por primera vez por Chester en 1946. Es un parásito obligado aunque puede ser cultivado en medios artificiales (Williams et al. 1966) pero su crecimiento es limitado (Katsuya et al. 1978). Aunque han sido descriptos hospedantes alternativos (Wahl et al. 1984), en Argentina y en general en

América es autoica, desarrollando todo su ciclo en trigo (fases haploides: basidiosporas, micelio, espermogonio; fases diploides: micelio dicariótico, ecidiosporas, uredosporas, teleutosporas). Las teleutosporas no se producen en condiciones de invernáculo o cámaras de cría, por lo que se utilizan uredosporas para las inoculaciones experimentales. Las uredosporas son normalmente las esporas de multiplicación del hongo en el cultivo, mientras que las teleutosporas constituyen las esporas de resistencia para la siguiente temporada.

4.2 Proceso de penetración de la roya

Las esporas del hongo germinan en la superficie de la hoja en condiciones apropiadas de luz (la irradiación continua es inhibitoria), humedad (alta) y temperatura (entre 18 y 25 °C). Este paso resulta crítico ya que si la espора germina en una hoja sin capa de cera, no puede adherirse y no desarrolla. El tubo germinativo crece en dirección perpendicular a la superficie de la hoja, maximizando la probabilidad de encontrar estomas que son los sitios de penetración (Wynn y Staples, 1981). Este hecho fue denominado como tropismo de contacto. En ese punto las células del tubo germinativo se diferencian en una estructura conocida como "apresorio", que cubre el estoma y se desarrolla produciendo un filamento que penetra a través del estoma en la cavidad subestomática. Allí se forma una vesícula subestomática que da lugar a la hifa de infección en la que se diferencian células madres de haustorios. El haustorio en contacto con células del mesófilo, rompe la pared (Wynn y Staples, 1981). A esta altura del proceso de infección, la interacción ya se perfila como compatible (el hongo puede seguir desarrollando y colonizar nuevo tejido) o incompatible (en este caso el hongo queda circunscripto al punto de penetración y no hay desarrollo ulterior).

Muchos cambios bioquímicos ocurren en las células del hongo cuando comienza la diferenciación. Hay síntesis de DNA, división celular, síntesis de nuevas proteínas y los elementos del citoesqueleto toman una nueva orientación (Staples y Macko

1984). Por lo menos una de las proteínas cuya síntesis se estimula forma parte del citoesqueleto. Estos cambios podrían estar involucrados en un mecanismo sensor del tubo germinativo que permitiría el desarrollo ulterior y penetración del hongo.

Ciertas royas como la que infecta soja penetran a través de la epidermis. En este caso es común la presencia de enzimas del hongo, como cutinasas, que facilitan el proceso de penetración.

Cutinasa; Las hojas están cubiertas por cutina que es un polímero de ácidos grasos hidroxí-epoxi, impregnado con ceras. La cutinasa es una esterasa cuyo sitio activo contiene serina, histidina y residuo carboxilo. Esta enzima es producida por una serie de hongos, la más conocida es la de Fusarium solani f.sp. pisi (Woloshuk y Kolattukudy, 1986). El gen de la cutinasa es inducido por monómeros de cutina estando la señal inicial a cargo de cutinasas constitutivas que se encuentran en baja concentración. Un cDNA que codifica para una cutinasa de este patógeno fue aislado por Soliday et al. (1984). La cutinasa tendría un papel importante en la penetración del hongo a la planta. Hay una serie de evidencias que apoyan lo antedicho:

- Está presente en los sitios de penetración (Shaykh et al., 1977)

- El tratamiento del inóculo con anticuerpos anti cutinasa previenen la infección en plantas sanas pero no en plantas heridas. (Maiti y Kolattukudy, 1979)

Inhibidores químicos de cutinasa también previenen la infección

- Mutantes deficientes en producción de cutinasas son avirulentas (Koller et al. 1982). En este último caso, la mutante pudo haber sido deficiente en otros factores esenciales para la penetración ya que el agregado de cutinasa al inóculo causó una restauración parcial de la virulencia en tejido sano.

4.3. Reacción hipersensible. Inhibición del crecimiento del hongo

En el sistema trigo-roya de la hoja, como en otros sistemas específicos, la interacción incompatible se caracteriza por necrosis celular en el sitio de penetración del hongo conocida como reacción hipersensible. En algunas interacciones incompatibles entre cereales y royas, el desarrollo del hongo es inhibido severamente en etapas muy tempranas mientras que en otros la expresión de la incompatibilidad es tardía.

4.3.1. Inhibición temprana del desarrollo del hongo

Hay sistemas en los que la necrosis celular precede a la inhibición del hongo y otros en que ocurre lo contrario.

El sistema trigo-roya del tallo, corresponde al primer tipo de reacción donde la necrosis del hospedante ocurre antes que la inhibición del hongo y dicha respuesta involucra al gen Sr5 (Rohringer et al, 1979). En este sistema se produce lignificación 24 hs. después de la inoculación, durante la inhibición del desarrollo del haustorio. Las células lignificadas se necrosan en este sistema. La inhibición de la lignificación permite el desarrollo del haustorio de igual forma en interacciones compatibles e incompatibles. Otro ejemplo de necrosis previa a la inhibición del hongo es el del gen Sr6 de trigo que determina resistencia a roya del tallo (Samborski et al. 1977).

Por otra parte en el sistema avena-Puccinia coronata (raza 226), la necrosis celular ocurre después que la inhibición del crecimiento del hongo. El crecimiento de la hifa se retarda a las 20 hs. después de la inoculación, comparada con el sistema susceptible, esto es antes de la formación del haustorio y del colapso celular que ocurre alrededor de las 28 horas (Tani y Yamamoto, 1979; Tani et al. 1975 a, b). Esto indica que ocurren importantes eventos en el espacio intercelular antes de la penetración del haustorio.

En el sistema trigo (portador del gen Lr20) para

resistencia a P. recondita, Jones and Deverall (1977a,b; 1978) encontraron evidencias de sustancias difusibles que posiblemente sean productos del gen Lr20. En este sistema, los cambios a nivel de células del huésped preceden a los cambios en hongos en por lo menos 18 horas. El análisis de protoplastos indica que estos colapsan 36 horas después de la inoculación, mientras que la inhibición del crecimiento del micelio se detectó recién 12 horas después del colapso. El modelo del gen Lr20 es sensible a la temperatura (es activo a 20 °C). Después de un tratamiento de calor seguido por transferencia de las plantas infectadas de 30°C a 20°C, se produjo necrosis alrededor de colonias avirulentas pero no alrededor de colonias virulentas. Se postula que una "toxina" es producida por el micelio avirulento a 30°C y las células respondieron a esta sustancia a menor temperatura cuando el gen Lr20 es activo. El tamaño del área afectada en el hospedante indica que la toxina es difusible.

4.3.2 Expresión tardía de la incompatibilidad:

Un ejemplo de expresión tardía de la reacción incompatible es el del sistema trigo-roya del tallo, especificada por los genes Sr8 y Sr22, donde aparecen células necróticas a las 60 o 72 horas posteriores a la infección.

El primer efecto significativo es la inhibición del crecimiento de la hifa del hongo desde el perímetro de las colonias establecidas. La inhibición tardía del crecimiento de la hifa se interpreta como el retardo de la expresión de los genes de avirulencia P8 y P22. La expresión tardía de estos genes podría deberse a que los productos de estos genes son sintetizados solo por las hifas o son producidos también en las colonias pero no son accesibles al hospedante de forma que no se produce el reconocimiento del patógeno avirulento. Alternativamente, la expresión tardía de la incompatibilidad puede deberse a un retardo en la expresión de los genes de resistencia, en respuesta a productos del hongo formados solo en estadios avanzados del desarrollo de la colonia.

Otro caso de inhibición tardía es la interacción avena-Puccinia coronata. Se encontraron haustorios muertos en células intactas y en células necróticas al cuarto día posterior a la inoculación, pero el crecimiento de la colonia no fue afectado hasta el sexto día después de la inoculación. En este sistema la muerte de las células del haustorio precede a la necrosis de la célula huésped.

El sistema trigo-Puccinia recondita tritici estudiado en este trabajo puede clasificarse dentro de este grupo pues la expresión de la incompatibilidad se manifiesta hacia el día 7 posterior a la infección, en las condiciones de inoculación y de cultivo que se detallan más adelante.

4.4. Mecanismos de defensa frente a la infección por patógenos

Las plantas responden a la infección de patógenos, al tratamiento con agentes desencadenantes o "elicitors" (moléculas en general derivadas de la pared celular de patógenos que inducen la producción de sustancias antifúngicas en plantas) o al daño mecánico con una serie de respuestas inducidas. La inducción de respuestas de defensa se observa generalmente en estadios tempranos de la infección por un no-patógeno o por una raza avirulenta de un patógeno confiriendo incompatibilidad con el resultado de una reacción hipersensible como en el caso del sistema trigo-roya de la hoja objeto de esta tesis (Figura 3).

Se han detectado compuestos preexistentes a la infección con patógenos y otros producidos posteriormente a la infección. Tales respuestas incluyen la síntesis de sustancias antimicrobianas (fitoalexinas); modificación de la pared celular (callosa, lignina); producción de proteínas PR ("pathogenesis related proteins), enzimas hidrolíticas, proteasas, etc.

En general puede decirse que la inducción de sustancias antimicrobianas se asocia con respuestas de resistencia inducida, no específica; ya que la misma sustancia se produce

frente a patógenos muy diferentes como hongos, bacterias y virus e incluso frente a agentes físicos y químicos. Pero existen evidencias de producción de este tipo de sustancias en reacciones hipersensibles caracterizadas como específicas y se postula que en estos casos la especificidad reside en un paso previo de reconocimiento entre hospedante y patógeno, que desencadena posteriormente una serie de cambios metabólicos que incluyen la producción de compuestos no específicos, como los mencionados a continuación (Fritig et al. 1987).

4.4.1 Productos del metabolismo secundario.

Estos metabolitos de respuesta involucran generalmente derivados del metabolismo de fenilpropano (Collinge y Slusarenko, 1987). Entre estos compuestos se encuentran las fitoalexinas y la lignina.

a) Fitoalexinas: son sustancias antimicrobianas, producidas por la planta, de bajo peso molecular, en general derivadas del metabolismo de la fenilalanina. Estos componentes son sintetizados "de novo", a partir de precursores y mediante enzimas cuya expresión aumenta en la reacción resistente. Hay dos grandes grupos que incluyen las furanocumarinas de perejil (Petroselinum crispum) y las isoflavonas de las leguminosas. En perejil (Petroselinum crispum) se observó (Hahlbrock et al. 1981) un aumento en el mRNA de tres enzimas: fenilalanina amonio liasa (PAL), 4-cumarato Coenzima A ligasa (4CL) y chalcona sintasa (CHS) y acumulación de furanocumarinas, cuando se infectaba con sustancias desencadenantes de un agente no patogénico para el perejil (Phytophthora megasperma f.sp. glycinea). Se detectaron dos genes para 4CL y por lo menos dos y posiblemente tres genes diferentes para PAL. En Phaseolus vulgaris, tanto con células en suspensión como con hipocótilos tratados con factores desencadenantes del patógeno Colletotrichum lindemuthianum se induce la transcripción de genes que codifican las enzimas PAL y CHS, 5 minutos después del tratamiento con el agente desencadenante (Collinge and

Slusarenko, 1987). La síntesis de estas dos enzimas parece estar regulada en forma coordinada mientras que la inducción de la síntesis de chalcona isomerasa (CHS) se produce posteriormente. Esta última estaría codificada por un solo gen, mientras PAL y CHS forman parte de una familia multigénica. Habría por lo menos tres genes estructurales para PAL y seis para CHS y se inducirían en forma diferencial en interacciones incompatibles. Las fitoalexinas más importantes en poroto son la faseolina y kievitona.

Otro ejemplo de producción de fitoalexinas es en soja (Glycine max). Como respuesta a la infección con el hongo Phytophthora megasperma f. sp. glycinea se induce la producción de las tres enzimas mencionadas anteriormente y la producción de gliceolinas 1, 2 y 3 (Collinge y Slusarenko, 1987). En este sistema se demostró que se inducen isoflavonas a partir de productos preexistentes en una zona estrecha de tejido, limitando así la infección (Graham et al. 1991). La forma en que estos antibióticos son inducidos se describe en la sección Desencadenantes y Receptores (4.4.6.).

Hay solo dos sistemas en los que se describió producción de fitoalexinas en cereales infectados por royas:

- Trigo (cultivar Little Joss) con la raza 104E137 de Puccinia striiformis (Cartwright y Rusell, 1980) donde se han detectado varias sustancias antifúngicas en la interacción incompatible.

- Avena y P. coronata (Mayama et al., 1981; 1982) donde hay producción de avenalinas. Sin embargo no se sabe si la respuesta resistente es desencadenada específica o inespecíficamente por polisacáridos o por glicoproteínas de hongos, ni si las fitoalexinas generalmente están involucrados en forma general en las respuestas de defensa de cereales contra royas.

b) Lignificación: La lignina es un polímero complejo, formado por condensación de unidades de fenilpropano y es un componente de la pared secundaria de plantas vasculares. Como

respuesta a la infección con diversos patógenos (hongos, virus, nematodos), se produce un aumento en la lignificación de la pared celular. En varias especies (papa, melón) se encontró que la lignificación está asociada a resistencia a patógenos. Variedades resistentes de melón producen más glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y lignina que variedades susceptibles y lo hacen más rápidamente. En Phaseolus vulgaris, la actividad de cinamil alcohol dehidrogenasa (CAD), la primera enzima involucrada en la lignificación, incrementa después de la infección con C. lindemuthianum. Esta inducción es simultánea con la producción de fitoalexinas en este sistema.

El proceso de lignificación es muy importante en especies tales como Phalaris arundinacea frente a la infección de Helminthosporium avenae o Vigna radiata inducida por Rhizoctonia solani. En trigo (Triticum aestivum) la lignificación está asociada a la reacción hipersensible en variedades resistentes a Puccinia graminis f.sp. tritici (Beardmore et al. 1983).

4.4.2 Modificaciones de la pared celular (excluyendo lignificación)

La extensina y proteínas ricas en hidroxiprolina juegan un papel importante en la estructura de la pared celular. Hay muchos ejemplos de aumento en glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) en tejidos heridos o inoculados de pepino (Cucumis sativus), melón (Cucumis melo), papa (Solanum tuberosum), trigo (Triticum aestivum), cebada (Hordeum vulgare) y arroz (Oryza sativa). La producción de HRGP y etileno se induce en melón con adición de un desencadenante derivado de Colletotrichum lagenarium. En soja con Phytophthora megasperma y en Phaseolus vulgaris con C. lagenarium; en poroto (Phaseolus vulgaris) la acumulación de HRGP se asocia a un aumento de la actividad de prolina-2-oxoglutarato dioxigenasa, propil hidroxilasa y una arabinosa transferasa. La actividad de mRNA codificante de propil hidroxilasa también aumenta a consecuencia del tratamiento con desencadenante. Se acumula

callosa (β 1-3 glucano) en las paredes de la planta en respuesta a estrés físico y químico y es un componente importante de aposiciones en la pared celular en los lugares de penetración de hifas de hongos fitopatógenicos. La callosa rodea infecciones locales en algunas infecciones virales donde puede contribuir a la prevención de la diseminación del virus. Por otra parte, la síntesis de callosa puede estar mediada por un influjo de iones Ca^{2+} en la célula que directamente activa a la enzima β 1-3 glucano sintetasa que se localiza en el plasmalema, más que por una expresión de genes "de novo" (Collinge y Slusarenko, 1987).

4.4.3 Enzimas hidrolíticas

Algunas hidrolasas como las quitinasas pueden ser consideradas proteínas secundarias ya que no tienen una función conocida en el metabolismo primario de las plantas y no producen los sustratos para los mismos. Pero debido a que pueden atacar importantes estructuras microbianas (quitina en pared celular de hongos), estas hidrolasas pueden ser consideradas armas de defensa contra patógenos. Con respecto a la resistencia a enfermedades pueden ser consideradas primarias.

Las enzimas hidrolíticas pueden contribuir al reconocimiento de patógenos, liberando productos de la pared celular de microorganismos invasores. Estos productos de hidrólisis pueden actuar como desencadenantes de reacciones de defensa.

Entre las enzimas hidrolíticas más importantes se puede citar:

4.4.3.1 Quitinasas y lisozimas:

Las quitinasas se encontraron por primera vez en semillas de poroto y fueron posteriormente purificadas de una gran variedad de plantas (Boller, 1985). En muchos casos el tratamiento con desencadenantes o la inoculación con patógenos

producen un incremento en la síntesis de etileno y quitinasas (Roby et al. 1987). El etileno actuaría como un segundo mensajero para la inducción de quitinasa en estos casos. En plántulas de melón inoculadas con Colletotrichum lagenarium el tratamiento con aminoetoxivinilglicina inhibe tanto la síntesis de etileno como la de quitinasas (Roby et al. 1986). Sin embargo en plantas de arveja (Pisum sativum) inoculadas con Fusarium solani f.sp. phaseoli o tratadas con desencadenantes, la síntesis de etileno se suprime pero no así la inducción de quitinasa (Mauch et al. 1989). Existirían por lo tanto diferentes mecanismos de inducción de quitinasas en distintas especies vegetales. En Phaseolus vulgaris la quitinasa está codificada por una familia multigénica y por lo menos dos de los componentes se expresan como respuesta al etileno (Hedrick et al, 1988). En melón se describieron dos quitinasas inducidas a los 5 ó 6 días de infección (Roby et al. 1987).

Tanto la quitina como el quitosano pueden actuar como desencadenantes de mecanismos de defensa. En trigo la quitina es desencadenante de lignificación al ser liberada por quitinasas. Las endoquitinasas también poseen actividad lisozímica y su inducción puede ser un mecanismo de defensa efectivo contra bacterias. En poroto, la quitinasa posee actividad hidrolizante de peptidoglicano sobre pared celular de bacterias. Por otra parte las lisozimas purificadas de varias especies vegetales (Ficus, Carica papaya, etc) tienen actividad quitinásica (Boller et al. 1983).

En la interacción poroto-Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola la inducción de mRNA que codifica para quitinasa se detectó a las seis horas después de la inoculación con un patógeno avirulento mientras que con una raza virulenta se detecta recién 24 hs después de la inoculación. En base a estos resultados se postula que habría una inducción temprana y específica del gen de la quitinasa en la interacción incompatible (Collinge y Slusarenko, 1987).

En la mayoría de las interacciones hospedante-patógeno en las que se detectó producción de quitinasas (incluyendo infecciones virósicas), éstas fueron localizadas

extracelularmente (Van Loon, 1982). Contrariamente a esto, en un trabajo reciente (Mauch y Staehelin, 1989) localizaron a las quitinasas exclusivamente en vacuola y les adjudicaron una función de defensa contra hongos. Se postula que estas enzimas son secretadas al espacio extracelular una vez colapsada la célula siendo entonces el mecanismo de control del hongo, más efectivo. En trabajos más recientes se determinó que las quitinasas tanto ácidas como básicas poseen un péptido señal que no presenta la proteína madura y que serviría para el transporte a través del retículo endoplasmático (Linthorst, 1991).

4.4.3.2 β -1,3-glucanasa

La actividad de la enzima β -1,3-glucanasa aumenta con el tratamiento de plantas con desencadenantes de patógenos. Estos desencadenantes son β -1,3-glucanos de la pared celular de hongos que son a su vez liberados por la acción de esta enzima. La inducción de esta enzima se encontró en plantas de arveja inoculadas o tratadas con desencadenantes de Fusarium. Los sustratos de esta enzima, contrariamente a lo que ocurre con la quitinasa, están presentes también en la planta. La callosa (β -1,3 glucano) está presente en los tubos cribosos, en aposiciones debidas a heridas y en la pared celular primaria.

En muchos casos se ha encontrado una inducción conjunta y correulación de quitinasas y β -1,3 glucanasas lo que indicaría una función común a ambas (Vögeli et al. 1988). Una β -1,3 glucanasa purificada de tomate ataca y digiere parcialmente la pared celular del patógeno Verticillium albo-atrum. La degradación de la pared celular es estimulada sinérgicamente por quitinasa (Young y Pegg, 1982). También una β -1,3 glucanasa purificada libera desencadenantes que promueven la producción de fitoalexinas (Keen y Yoshikawa, 1983). En el sistema tomate-Cladosporium fulvum se induce más tempranamente y en mayor proporción en interacciones incompatibles que compatibles (De Wit et al. 1988). Se han detectado en mayor

proporción en vacuolas que en pared celular (Mauch y Staehelin 1989; Benhamou et al. 1989).

4.4.3.3 Otras hidrolasas

Celulasa: Es importante en la degradación de pared celular de plantas y ha sido estudiada en relación a la abscisión. Hay dos tipos de celulasas, una específica de abscisión y otra constitutiva. La constitutiva no tiene función conocida (algunos hongos contienen celulosa en vez de quitina en su pared celular que podría ser el blanco de estas celulasas de plantas).

Glicosidasa: No se sabe mucho acerca de la especificidad de sustrato de estas enzimas. Para algunas de ellas existen sustratos presentes en las paredes de hongos.

α Manosidasa y β -N acetilglucosaminidasa: se encuentra en vacuolas y la primera también en pared celular de plantas. Su función primaria es el recambio de glicoproteínas de plantas y pueden tener una función secundaria, atacando estructuras de la pared celular de patógenos.

Proteinasa: Las plantas infectadas tienen mayor actividad de proteasas, secretadas por los patógenos. La planta se defiende produciendo inhibidores de proteasas (Ryan et al. 1985). Por otro lado la planta produce proteinasas que pueden degradar proteínas estructurales o enzimas secretadas por el hongo.

Ribonucleasa: Aumentan en plantas infectadas por lo que tendrían alguna acción en la defensa contra virus.

Fosfatasa: Se han detectado fosfatasas ácidas en pared celular. Podrían atacar componentes fosforilados de la pared de hongos pero éstos también liberan fosfatasas para acceder a fuentes de fósforo orgánico.

4.4.4 Proteínas relacionadas con la patogenesis (PR)

Son proteínas que se inducen en una gran variedad de plantas como tabaco, tomate, papa, maíz y cebada (White 1987),

como respuesta a la infección de una gran cantidad de patógenos (virus, bacterias y hongos). Fueron descubiertas por Gianinazzi et al. (1970) y Van Loon y Van Kammen (1970) en plantas de tabaco con respuesta hipersensible a la infección con virus del mosaico de tabaco. Estas proteínas, que no se encuentran en la planta sana, se inducen en grandes cantidades y están asociadas con infecciones localizadas. En el caso de los virus se postuló que intervendrían en la localización del virus pero hay casos de infecciones localizadas en los que no se han detectado proteínas PR y casos de infecciones sistémicas en las que sí están presentes (Antoniw y White 1987)

Estas proteínas relacionadas con la patogénesis son inducidas no solo por patógenos sino también por tratamiento de plantas con agentes desencadenantes aislados de pared celular de hongos como así también por acción de agentes químicos (etefón, ácido salicílico, aspirina, ácido benzoico, polianiones, ácido poliacrílico). Se encontró que están asociadas con resistencia inducida aunque no son necesariamente responsables de ella (Antoniw y White 1987)

En tabaco se describieron y caracterizaron muchas proteínas PR (Bol et al. 1987). La PR-1 de tabaco está serológicamente relacionada con proteínas PR de otras solanáceas e incluso con una PR de maíz, de 17 KDa, infectado con BMV y con una de cebada inoculada con una raza compatible de Erysiphe graminis tritici, de 15 KDa (White et al. 1987).

Este grupo abarca una gran diversidad de proteínas, la mayoría de función aún desconocida, con las siguientes características:

- proteínas extraíbles a pH ácidos
- bajo peso molecular
- Acumulación extracelular
- Resistencia a muchos tipos de proteasas
- codificadas por familias multigénicas (por ejemplo las PR1 de tabaco).

Ultimamente se han detectado también PR básicas que serían transportadas a vacuolas. Una de las diferencias entre PRs básicas y ácidas es que éstas últimas se inducen con etileno y

por heridas (Linthost 1991). La función de la mayoría de ellas es desconocida. Algunas enzimas que previamente se habían descrito como proteínas PR fueron posteriormente caracterizadas como quitinasas y β -1,3 glucanasas (en papa, tomata, tabaco) frente a distintos agentes patógenicos. Estas incluyen hidrolasas recientemente caracterizadas como quitinasas y β -1,3 glucanasas (Mauch y Staehelin, 1989).

4.4.5. Inhibidores de proteasas

Son activos contra proteasas animales y no contra las propias. Por ejemplo en tomate aparecen dos proteínas de este tipo 48 hs luego de producida una herida. Juegan un papel importante en la resistencia a insectos y en el caso de resistencia específica a virus en el mosaico del caupí. Las proteínas de este virus son sintetizadas en un principio como una poliproteína que es clivada en lugares específicos por una proteasa, la cual es inhibida en las plantas inmunes por un inhibidor codificado por la planta, impidiendo así la aparición de proteínas virales y el posterior progreso de la infección (Sanderson et al. 1985).

4.4.6. Inducción de enzimas de defensa. Desencadenantes y receptores

La mayoría de los desencadenantes que inducen respuestas de defensa en la planta, no son específicos de raza (Dixon 1986). Entre ellos se incluyen: 1,3 β -D glucanos, glicoproteínas ricas en galactosa y manosa, quitosano y ácido araquidónico. Por ejemplo un β -glucano de bajo peso molecular (Sharp et al. 1984) aislado de Phytophthora megasperma f.sp. glycinea, induce la producción de una fitoalexina (gliceolina) en soja. Por otro lado, una glicoproteína aislada de una raza compatible de P. megasperma inhibe específicamente la acción de desencadenantes no específicos (Ziegler y Pontzen, 1982).

Se propuso que el aumento o supresión de la inducción de estos agentes desencadenantes serían posibles determinantes de

especificidad hospedante-patógeno. Se encontró que desencadenantes de Phytophthora infestans de razas compatibles suprimen la reacción hipersensible inducida por razas incompatibles. Los supresores podrían actuar por competencia por un sitio de unión con desencadenantes. Hay solo dos casos en los que se reportaron desencadenantes específicos de raza de hongos patogénicos (Lamb et al. 1989):

- Glicoproteína rica en galactosa-manosa de la raza α de C. lindemuthianum: Induce producción de fitoalexinas en poroto resistente a esta raza, pero no en cultivares compatibles (Tepper y Anderson 1986)

- Polipéptido que induce necrosis, presente en espacios intercelulares de tomate infectados por Cladosporium fulvum As (De Witt et al. 1988).

Aún en estos dos casos, cuando se usaron desencadenantes obtenidos a partir de pared de micelio no mantuvieron la especificidad del organismo entero, sugiriendo que los determinantes de especificidad se expresan en la planta infectada.

Hay desencadenantes de origen endógeno:

- Oligogalacturonósidos de pared celular que inducen fitoalexinas e inhibidores de proteasas. Se detectó un aumento en la actividad desencadenante de hongos por acción de desencadenantes endógenos. Habría un sinergismo entre desencadenantes de ambos orígenes. Debido a que tanto los desencadenantes del patógeno como los de la planta son inespecíficos la interacción sinérgica entre ellos no otorgaría especificidad de raza (Lamb et al. 1989).

Para explicar la forma en que estos desencadenantes son detectados por la planta y la forma en que se produce la inducción de la síntesis de las hidrolasas de defensa, se postula la presencia de receptores en membrana plasmática. Sin embargo, no se pudieron identificar receptores específicos hasta el presente. Hay un solo caso descrito de un receptor en soja. Un glucano de pared de Phytophthora megasperma se une a la

membrana celular de la planta pero esta unión no es específica ya que es competitiva por desencadenantes distintos a dicho glucano (Schmidt y Ebel, 1987).

4.5. Mecanismos de virulencia conocidos en patógenos:

En la mayoría de las interacciones hospedante-patógeno, particularmente aquellas específicas (de interés en este trabajo), se desconoce los mecanismos de virulencia de los patógenos involucrados así como también los mecanismos de reconocimiento por parte del hospedante. A continuación se describen dos mecanismos de virulencia conocidos para dos tipos de patógenos que si bien no se consideran parásitos obligados, contribuyen al conocimiento de los mecanismos generales involucrados en este tipo de interacciones.

4.5.1. Detoxificación:

Pisatina demetilasa: En plantas de arveja inoculadas con el patógeno Nectaria haematococca se produce un antibiótico (fitoalexina) llamado pisatina. Esta sustancia inhibe en forma generalizada el crecimiento de muchos hongos, incluyendo algunas razas de este patógeno. Las razas virulentas son tolerantes a pisatina. La tolerancia a pisatina está dada por la producción de pisatina demetilasa que la detoxifica, removiendo grupos metilo (VanEtten et al. 1989).

4.5.2. Producción de toxinas:

Patotoxinas: Son sustancias producidas por patógenos durante la infección del correspondiente hospedante.

La primera toxina descrita fue en avena infectada con Helminthosporium victoriae. Se correlacionó la virulencia del

patógeno con la capacidad de producir la toxina. A partir de este descubrimiento se produjeron una serie de descripciones de este tipo de toxinas en distintos cultivos y con distintos patógenos. Se consideró la toxina "victorina" como un requisito específico para que el patógeno desarrolle en variedades de avena susceptibles. (Scheffer y Pringle, 1967). Por este motivo se la describió como una toxina "hospedante-específica". Otro ejemplo es la toxina de H. maydis, raza T, que puede causar enfermedad en maíz con citoplasma androesteril T. La toxina no se requiere para patogenicidad "per se", pero causaría daño celular adicional en plantas susceptibles, aún en tejidos distantes al foco de infección. En éste y otros casos similares, se trata de toxinas no específicas y serían determinantes secundarios de la enfermedad. No serían necesarias para la penetración y patogénesis inicial.

Se pueden distinguir dos grupos de toxinas:

- Hospedante-específicas: aquellas patotoxinas que tienen efectos sobre cultivares susceptibles y no sobre resistentes.
- Hospedante-selectivas: aquellas involucradas en determinar patogenicidad sobre una especie determinada independientemente de la variedad infectada.

En cuanto a la composición química de las toxinas, la toxina de Alternaria mali es un péptido. No así la toxina de la raza T de H. maydis. Para aquellas en las que no se detectaron uniones peptídicas, no se sabe qué produce la especificidad.

Sitios de acción de las patotoxinas

No se conocen los mecanismos por los que estas toxinas causan daño. Se postula que podría haber tres sitios de acción: membrana plasmática, mitocondria o una enzima específica (Daly y Knoche, 1980).

4.6. Resistencia y susceptibilidad inducida

La inducción de resistencia en plantas a un patógeno que

normalmente desarrolla una interacción compatible por inoculación previa con un no patógeno se ha descrito en una serie de sistemas H-P específicos incluyendo la relación trigo-Puccinia recondita tritici (Bahamish y Wood 1984; Schweizer et al. 1989). También se ha reportado susceptibilidad inducida en hospedantes resistente a determinadas razas de patógenos que se tornan susceptibles después de ser inoculados con un patógeno virulento (Ouchi et al. 1974 a y b; Ouchi et al. 1976). Algunos autores (Kiyosawa y Nomura 1988) opinan que es más fácil explicar la resistencia inducida que la susceptibilidad inducida. De todos modos, ambos fenómenos parecen ser inducidos por genes distintos a los que determinan especificidad de la relación hospedante-patógeno. Se trataría de genes que actúan en una segunda etapa después de producido el reconocimiento específico (Ellingboe 1978).

5. ORGANIZACION GENICA DE SEGMENTOS ISOFENICOS EN CEREALES

Los genes que confieren resistencia a enfermedades (particularmente royas y oídios) se encuentran organizados en loci multigénicos que se alternan con familias multigénicas caracterizadas de proteínas de reserva de grano formando segmentos isofénicos en el cromosoma 5 de cebada y en los cromosomas homeólogos del grupo 1 y 6 en trigo. En cebada los genes que codifican para hordeínas (Jensen et al. 1980) alternan con genes de reacción a oídio (Erysiphe graminis hordei). En trigo los genes del gliadinas en el cromosoma 6 alternan con genes de reacción a roya (Puccinia graminis y Puccinia recondita tritici) (Solari y Favret 1968, Favret et al. 1969, Favret 1969).

5.1 Localización cromosómica de genes de reacción a roya

En muchas líneas de trigo no se conoce la ubicación cromosómica de los genes de reacción a roya. En la variedad Sinvalocho M.A. que es una de las líneas estudiadas en este trabajo el gen que codifica para reacción a una de las razas

(clon FO₁) se ubica en el cromosoma 6 de trigo.

5.2 Localización de genes que codifican para proteínas de reserva.

Las proteínas de reserva de los granos de cereales comprenden varias fracciones que se separan en base a su solubilidad relativa (Osborne, 1907). Los dos grupos más abundantes de proteínas de reserva de los granos de trigo son las gliadinas y glutelinas, a las que corresponden más del 45% del total del nitrógeno del grano maduro.

Las primeras, solubles en etanol 70%, son monoméricas y tienen un peso molecular de hasta 3600 Daltons, no presentan en general puentes disulfuro. Cuando se fraccionan por electroforesis a bajo pH se separan en cuatro grupos.

Otras familias de gliadinas son ricas en enlaces disulfuros, intra e intermoleculares, requieren para su solubilidad de reductores como el β -mercaptoetanol y pueden llegar a 44000 Daltons. Estas proteínas están codificadas por lo menos por tres familias de genes:

- a) tipo α/β
- b) tipo γ
- c) tipo ω

Las glutelinas son proteínas de mayor peso molecular pudiendo llegar a 133000 daltons. Están formadas por diferentes subunidades conectadas por puentes disulfuro. Hay dos grupos, uno de bajo y otro de alto peso molecular. Se sabe que algunas subunidades de glutelinas están asociadas a calidad panadera.

Los genes que codifican las gliadinas fueron localizados en los brazos cortos de los grupos 1 (subunidades γ y ω) y 6 (α y β). La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de las gliadinas y demuestran que pertenecen a un grupo común. Gli A₂ y Gli B₂ estarían en posiciones similares en los respectivos cromosomas, hacia el extremo distal. La secuencia nucleotídica mostró una alta homología entre genes de los loci Gli-1 y Gli-2 (por ejemplo entre las gliadinas γ y α/β). Estos dos genes

provendrían de la duplicación y posterior divergencia de un ancestro común. En cambio, el control de las glutelinas corresponden a genes localizados en los brazos largos de los cromosomas 1A, 1B y 1D. Los loci que contienen los genes de las subunidades de glutelinas de alto peso molecular se llaman Glu-1. Las variedades de trigo contienen entre 3 y 5 bandas de alto peso molecular: 2 codificadas por los genes Glu D1; 1 ó 2 por los genes Glu B1 y 1 o ninguna por Glu A1.

En las líneas en estudio en el presente trabajo (Sivalocho M.A. y Gamma 1R) se detectaron variaciones en el patrón electroforético de gliadinas y a su vez se determinó que uno de los genes que codifica para una banda está ligado a uno de los genes involucrados en la reacción a roya (Solari y Favret 1969, Favret et al. 1969, Favret 1969).

En la actualidad se cuenta con clones correspondiente a genes tanto de gliadinas (Okita et al. 1985, Harberd et al. 1985) como de glutelinas (Harberd et al. 1987).

5.3 Utilización de genes de proteínas de reserva como marcadores de genes de reacción a roya

Teniendo en cuenta:

a) que no ha sido posible aún clonar genes de resistencia/susceptibilidad de plantas a hongos como royas, oídios u otros patógenos,

b) que los genes de reacción a roya están organizados en segmentos isofénicos junto con genes que codifican proteínas de reserva,

c) que se cuenta con genes de glutelinas y gliadinas ya clonados,

se plantea la posibilidad de utilizar alguno de los clones de gliadinas como marcador de alguno/s de los genes de reacción a roya. A través de técnicas moleculares como caminado o saltado cromosómico, podría llegarse a alguna de las secuencias de reacción a roya de interés.

6. BIOLOGIA MOLECULAR DE LA RELACION HOSPEDANTE-PATOGENO

6.1. Modelos moleculares de reconocimiento hospedante-patógeno

6.1.1. Compatibilidad específica vs. incompatibilidad específica

Muchos de los sistemas hospedante-patógeno considerados altamente específicos, que involucran por ejemplo royas y oídios, pueden ser explicados genéticamente por el modelo de Flor, con las modificaciones mencionadas anteriormente. No obstante esto, los mecanismos moleculares que rigen ese reconocimiento específico de tipo "gen por gen" o "alelo a gen", aún no han podido ser dilucidados.

Se han propuesto varias hipótesis acerca de si la especificidad de la relación hospedante-patógeno es hacia compatibilidad o incompatibilidad (Browder et al. 1986; Damman 1987; Ellingboe 1981, 1984; Favret 1971; Loegering et al. 1981; Vanderplank 1984).

Según el modelo de Flor el reconocimiento específico se daría en la interacción incompatible ya que es un caso único considerando las combinaciones génicas del "quadratic check", siendo las tres restantes interacciones compatibles con genes interactuantes distintos produciendo la misma sintomatología (Cuadro 6 A). Sería un modelo de reconocimiento positivo (Fraser, 1980) donde un producto del hospedante "resistente" reconoce un producto de la raza avirulenta, dando como resultado una interacción incompatible.

Hay tres líneas de evidencias fundamentales que sostienen el reconocimiento para incompatibilidad. Una de ellas surge de los experimentos realizados por Flor (1960) que observó, estudiando mutaciones inducidas por rayos X en la raza 1 de Melampsora lini, que la virulencia sobre lino es el resultado

de una delección en un gen dominante de avirulencia. Esto indica que una función inhibitoria del producto de este gen podría explicar la especialización fisiológica en la roya del lino.

La segunda línea de evidencia surge de estudios realizados sobre la interacción trigo-roya del tallo utilizando mutantes termosensibles. Se observó que a temperatura no permisiva, donde la proteína codificada por el gen mutado no es funcional, hay susceptibilidad (Ellingboe 1976).

Finalmente, la otra línea de evidencia viene dada por los experimentos de Staskawicz et al. (1984) en el sistema Pseudomonas syringae pv. glycinea-Glicine max. Cuando los distintos clones de una genoteca de la raza 6 de Pseudomonas fueron transconjugados en otras 3 razas, se obtuvo un patrón de incompatibilidad, no de compatibilidad, idéntico al de la raza 6 al infectar distintas variedades de soja.

Otros autores (Vanderplank 1984) postulan que las tres combinaciones compatibles del "quadratic check" que confieren compatibilidad son el resultado de un reconocimiento específico que se daría a nivel proteico. Según esta teoría habría una falla en el reconocimiento de los productos de hospedante y patógeno en la interacción incompatible, que impediría que el patógeno desarrolle sobre el hospedante "resistente". Se trataría entonces de un modelo negativo, según Fraser. Los sistemas que involucran producción de toxinas por parte de los patógenos involucrados, responden a este tipo de modelo (por ejemplo avena-Helminthosporium). En estos casos, el hospedante es portador de un "gen" que confiere "susceptibilidad" a la toxina producida por el patógeno (el sitio de acción de la toxina, por ej. la enzima afectada). Las interacciones de los tres cuadrantes restantes (Cuadro 6 B) dan interacciones incompatibles. Según algunos autores (Damann 1986) estos sistemas que involucran toxinas no son comparables con los sistemas que involucran patógenos biótrofes como royas y oídios.

Las dos hipótesis se pueden representar comparativamente del siguiente modo:

Cuadro 6

		A		B		
		HOSPEDANTE		HOSPEDANTE		
		R-	rr		Vb-	vbvb
P	A-	-	+	tox+	+	-
A						
T	aa	+	+	tox-	-	-
O						

(-) reacción incompatible

(+) reacción compatible

6.1.2. Modelo de "compatibilidad básica" en interacción H-P

Elligboe (1976) y Heath (1984b) discutieron el tema postulando que la especificidad de hospedante puede estar primariamente determinada por una "compatibilidad básica" entre hospedante y patógeno. Desde un punto de vista evolucionista, la interacción hospedante-patógeno después de un largo período de tiempo, permitiría el intercambio de compuestos de bajo y alto peso molecular y posiblemente también organelas, llegando a un estado de armonía o coexistencia (simbiosis en sentido amplio), que estos autores denominaron compatibilidad básica. Este estado puede ser alcanzado sólo si el patógeno no ha desencadenado o ha superado, reacciones de defensa no específicas del tipo de resistencia por "no huesped" o sea si se establece una relación de "susceptibilidad inducida". Esta estrecha interacción entre ambos organismos diferenciaría a relaciones que involucran patógenos obligados de aquellas en que el patógeno puede vivir independientemente del hospedante.

Bushnell y Rowell (1981), propusieron una hipótesis para explicar, a nivel molecular, la relación entre "compatibilidad básica" y "cultivar resistente". Se postula que receptores específicos en el hospedante reconocen supresores derivados del hongo y que este reconocimiento hace inoperable los mecanismos de defensa, desencadenados en respuesta a factores producidos por el hongo. Esto llevaría a un estado de compatibilidad

básica. Si el hospedante adquiere un gen que confiere resistencia alterando en sitio receptor para el supresor, el supresor no actúa, tiene lugar la actividad desencadenante (cultivar resistente), hasta que la población del patógeno, a través de mutación y presión de selección, adquiere el gen correspondiente de "resistencia". Se restauraría así el reconocimiento receptor-supresor, y el desencadenante no sería más efectivo. El Esquema 1 resume lo expuesto en cuanto a dinámica de la interacción hospedante-patógeno según esta teoría (Heath et al. 1981).

Esta hipótesis separa el problema de especificidad en distintos niveles interconectados y asigna especificidad a supresores del hongo. Esto está en contra a la teoría convencional por la cual los desencadenantes también derivados del hongo, serían los responsables de inducir por ejemplo la síntesis de fitoalexinas, determinando la especificidad.

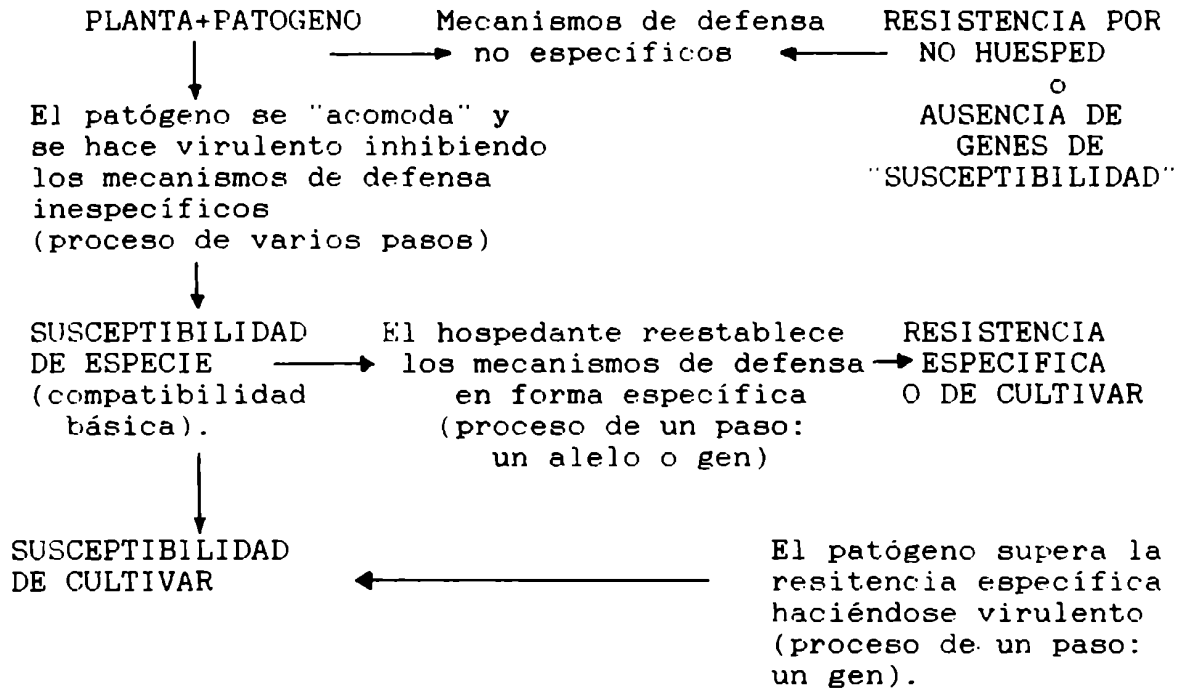
6.1.3. Etapas de reconocimiento entre hospedante y patógeno. Modelo de complementación.

En una interacción H-P específica se pueden distinguir dos etapas de reconocimiento:

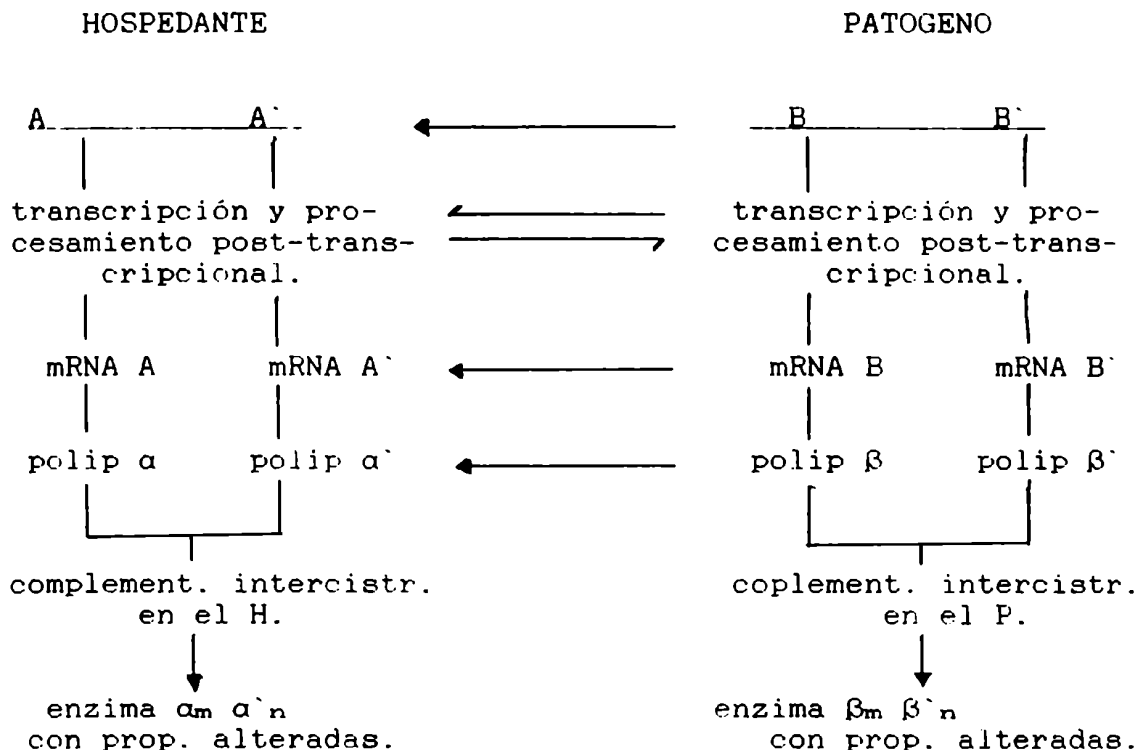
1) Ocurre cuando los dos organismos entran en contacto. En esta etapa juega un rol vital el llamado "reconocimiento celular" en el que están involucrados pared y membranas celulares. En plantas superiores el caso mejor conocido es la interacción entre la pared celular de Rhizobium sp. y las lectinas de las raíces de leguminosas en la entrada de la bacteria a la planta. Otro caso sería el reconocimiento de acetosiringonas producidas por leguminosas heridas (son intermediarias del metabolismo de la lignina) por parte de Agrobacterium tumefaciens (Ashby et al. 1987).

2) Ocurre cuando el patógeno se desarrolla vegetativa y reproductivamente en las combinaciones compatibles. En las incompatibles en las que el patógeno no fue eliminado en 1), la etapa 2) es rápida y resulta en la limitación o exclusión del patógeno.

Esquema 1 : Interacciones que determinan especificidad de cultivar.



En un intento de explicar estas interacciones a nivel molecular, Chakravorty y Shaw (1977) propusieron un modelo llamado "de complementación":

Esquema 2: Modelo de complementación hospedante-patógeno

A, A', B, B' representan genes del hospedante y del patógeno respectivamente que pueden estar relacionados gen a gen como se postula en la hipótesis de Flor. Previa a la aparición del patógeno sólo se expresa en el hospedante el gen A' produciendo la enzima multimérica α'_n . Cuando el patógeno comienza a desarrollarse reproductiva y vegetativamente sobre el hospedante, un factor del patógeno induce la expresión de A conduciendo a la síntesis de α_n . La complementación (definida operacionalmente como la interacción de polipéptidos distintos que resulta en una alteración en la cantidad y las propiedades de una enzima multimérica) da por resultado $\alpha_m \alpha'_n$ con propiedades catalíticas nuevas. En una interacción compatible, la función de esta enzima es esencial para la continuación de la interacción H-P. Un proceso similar ocurre en el patógeno a partir de un factor Y del hospedante.

Se postula que las enzimas que sufren cambios en cantidad (aumento o disminución) y/o propiedades (catalíticas, regulatorias, estabilidad) en esta segunda etapa de la relación

H-P son aquellas que catalizan los pasos iniciales de la expresión génica como la transcripción (RNA polimerasas) y procesamiento postranscripcional (RNAsas, metilasas modificadoras de nucleótidos). Los cambios en estas enzimas inician una cascada de eventos que llevan a la aparición de varias enzimas del metabolismo intermediario de manera que no se requieren más sustancias inductoras.

Un ejemplo por excelencia para este modelo es el caso del fago en *B. subtilis*. El genoma del fago codifica para un factor de tipo σ que reemplaza la subunidad correspondiente de la RNA polimerasa del huésped modificando el sitio de reconocimiento en los promotores de los genes. De esta manera gatilla la expresión diferencial de los genes virales en detrimento de los del huésped, desarrollando la "enfermedad" (Lewin 1990).

6.2. Evidencias de cambios moleculares en interacciones H-P específicas.

Tanto la incompatibilidad o "resistencia de cultivar", como la compatibilidad o "susceptibilidad" requieren interacciones H-P altamente específicas.

Si bien los modelos planteados anteriormente son factibles, no hay evidencias moleculares categóricas que los avalen decididamente en plantas y los "factores" que juegan un papel fundamental en el reconocimiento, en su mayoría no han sido identificados.

En el apartado "Fitoalexinas" y "Desencadenantes y Receptores" se citaron casos de sustancias de bajo peso molecular (glucanos) que inducen la producción en general inespecífica de sustancias antimicrobianas. También se habían citado casos de glicoproteínas de hongos que inhiben específicamente (supresores específicos) la acción inespecífica de desencadenantes (Lamb et al. 1989). Como se mencionara allí, solo han sido descritos dos casos de desencadenantes específicos de hongos en los sistemas poroto-*Colletotrichum lagenarium* (Tepper y Anderson 1986) y tomate-*Cladosporium fulvum* (De Witt et al. 1988) En cuanto a receptores en plantas para estos desencadenantes, sólo se describió un caso en

membrana plasmática en soja infectada con Phytophthora megasperma. Por otra parte las lectinas localizadas en muchas plantas, con capacidad de unirse a glucanos de patógenos, podrían intervenir en el reconocimiento ya sea para incompatibilidad como para compatibilidad (Schmidt y Ebel, 1987) pero éstas son hasta ahora especulaciones.

En los sistemas altamente específicos como el que está en estudio aquí, cabe esperar cambios metabólicos en el hospedante que requieren la síntesis de nuevos RNA y enzimas claves como RNA polimerasas II y Ribonucleasas (Chakravorty 1977; Chakravorty et al. 1974; Chakravorty et al. 1980). Estos cambios producidos durante etapas tempranas de la infección con roya fueron estudiados en varios hospedantes (Chakravorty y Shaw 1977; Ealing et al. 1984; 1985; 1986) e incluyen por ejemplo cambios en ribonucleasas respecto a pH, especificidad de sustrato, estabilidad térmica, Km y Vmax. en roya del tallo en trigo y roya del lino (Chakravorty et al. 1974 b,c). La pregunta que debe dilucidarse es si estas RNA polimerasas y ribonucleasas están involucradas en la expresión de interacciones gen a gen específicas o sólo en aquellas de "compatibilidad básica" de hospedante y patógeno.

El modelo de complementación entre subunidades producidas por el hospedante y por el patógeno, descrito en el punto anterior, no fue confirmada (Sutton y Shaw 1982) y se propuso que las diferencias encontradas en polimerasas y ribonucleasas pueden ser atribuidas a las cantidades relativas de diferentes isozimas durante la patogénesis.

En cuanto a cambios proteicos inducidos por infección con patógenos se describieron diferencias en polipéptidos de plantas infectadas con roya respecto a plantas sanas en los sistemas Avena-Puccinia coronata (Yamamoto y Tani 1979) y trigo-roya del tallo (Pure et al. 1979). En estos trabajos no se compararon interacciones compatibles e incompatibles por lo que no puede hablarse de especificidad. En el sistema lino-Melampsora lini, Von Broembsen y Hadwiger (1972) describieron cambios proteicos específicos en cuatro interacciones incompatibles entre 6-18 horas después de la

inoculación. En cebada infectada con oídio, Manners et al. (1985) describieron inhibición en la síntesis de polipéptidos en interacciones incompatibles.

Cambios proteicos no específicos fueron descritos también en interacciones incompatibles de trigo-Erysiphe graminis tritici como consecuencia de la inducción con un no patógeno Erysiphe graminis hordei (Schweizer et al. 1989). En este sistema se clonó el cDNA que codifica para estos cambios inespecíficos habiéndose caracterizado a uno de ellos como una peroxidasa.

En cuanto al clonado de genes específicos del reconocimiento entre hospedante y patógeno, no han podido aún aislarse ni en el hospedante ni en el patógeno, con excepción del clonado de genes de avirulencia de Pseudomonas syringae mencionado anteriormente (Staskawicz et al. 1985, Kobashi et al. 1990).

Algunos autores han descrito también disminuciones en la traducción de RNA de plantas susceptibles comparadas con las de plantas sanas (Manners y Scott 1985).

OBJETIVOS

De lo expuesto anteriormente se desprende la falta de información acerca de los productos específicos de hospedante y patógeno que intervienen en el reconocimiento de ambos organismos y la escasez de sistemas genéticos apropiados para poder asignar productos inducibles durante la infección con un patógeno a determinados genes de reacción del hospedante, o mejor aún a determinada interacción de genes de hospedante y patógeno. La identificación de estos productos específicos hará posible el clonado de secuencias de cDNA específicas que a su vez facilitará el clonado del/los gen/es involucrados en el reconocimiento hospedante-patógeno.

A partir de un sistema bien caracterizado desde el punto de vista genético, compuesto por líneas isogénicas o cuasi-isogénicas del hospedante Triticum aestivum y clones genéticamente relacionados del patógeno Puccinia recondita tritici, son objetivos de esta tesis:

- Estudio a nivel molecular de la organización de segmentos "isofénicos" en trigo que incluyen genes de reacción a P. recondita tritici y genes que codifican para proteínas de reserva. Identificación de marcadores génicos de genes de reacción a P. recondita tritici

Detección de cambios polipeptídicos en interacciones compatibles e incompatibles a lo largo del proceso de infección con el patógeno roya de la hoja.

- Identificación de polipéptidos específicos de relaciones hospedante-patógeno compatibles y/o incompatibles, diferenciándolos de cambios polipeptídicos inespecíficos.

Determinación de variaciones a nivel de traducción de RNAs mensajeros específicos de diferentes interacciones compatibles e incompatibles a lo largo del proceso de infección.

- Asignación de los cambios proteicos y/o de RNAs mensajeros a las interacciones génicas en estudio.

- En base a los datos obtenidos, discutir las alternativas de determinación del sentido de reconocimiento: "compatibilidad vs. incompatibilidad específica" para el presente sistema.

- Clonado e identificación de secuencias de cDNA que codifican para alguna de las proteínas diferenciales detectadas.

**MATERIALES
Y
METODOS**

1. Material biológico

A. Hospedante y patógeno

La variedad Sinvalocho M.A. de Triticum aestivum es un producto del cruzamiento de Klein Sin Rival x 38 M.A., y lleva el gen A_0 de reacción a roya de la hoja (Favret 1965, Favret et al 1969, Franzone et al 1982, Mujica et al 1972). La mutante Gamma 1R fue obtenida por tratamiento mutagénico de Sinvalocho M.A. con rayos gama seguida de cruzamientos con la línea madre y selección en la 3^o y 4^o generación (Favret 1965, Favret et al 1969, Franzone et al 1982). Análisis genéticos han demostrado que los cambios en la reacción a roya de la hoja están asociados con dos genes nuevos: A_1 y A_2 . El gen A_1 es un derivado del gen A_0 original de Sinvalocho M.A. pero que se encuentra en otro cromosoma dado que segrega independientemente: es decir, se produjo una transposición. Una relocación de A_1 a la posición original por recombinación, dió lugar al gen A_2 (Favret et al 1969).

Las líneas Sinvalocho M.A. y Gamma 1R son por lo tanto casi isogénicas, difiriendo en genes de reacción a roya y en genes ligados a éstos, como son los de proteínas de reserva.

Enfrentado con el clon FO₁ de P. recondita tritici (antes llamado 66), el gen A_0 para reacción a roya de la hoja presente en Sinvalocho M.A. es de expresión recesiva. Por otro lado, este mismo gen se comporta como dominante cuando se lo enfrenta al clon FO₂ (Franzone et al, 1982). Hay otro gen en Sinvalocho M.A. para reacción a FO₂ que también es de expresión dominante.

El clon FO₁ de roya establece una reacción compatible con el mutante Gamma 1R (ver tabla 1). El clon FO₂ (antes llamado 20) está genéticamente relacionado a FO₁. Este último es posiblemente heterocigota para el alelo recesivo p_0 que interacciona con el gen A_0 de Sinvalocho M.A., mientras que FO₂ es homocigota para el mismo gen (Franzone et al. 1982, Suárez et al. 1984).

La incompatibilidad de Gamma 1R-FO₂ se debe a los genes de reacción A_1 y A_2 , ambos de expresión dominante, y que participan

a veces uno y a veces ambos en la reacción (Franzone et al. 1982).

El clon F₃ de roya (antes llamado 77) interacciona de manera opuesta a FO₁ (ver tabla 1). La reacción de Gamma 1k a FO₃ está conferida por dos genes: uno de ellos es el mismo que reacciona con FO₂ y el otro segrega independientemente (F. Sacco, comunicación personal).

Finalmente la incompatibilidad de Sinvalocho M.A.-FO₂ podría estar relacionada con la incompatibilidad con FO₃. Esta sugerencia está basada en el hecho que mutantes espontáneas que muestran compatibilidad con FO₃, simultáneamente se vuelven incompatibles con FO₂ (F. Sacco, comunicación personal).

La tabla 1 resume las interacciones H-P del sistema en estudio y los genes involucrados en ellas.

clones del patógeno			
	F0 ₁	F0 ₂	F0 ₃
Líneas isogénicas de trigo	p ₀ P ₀ p ₁ P ₁ p ₂ P ₂	p ₀ P ₀ P ₁ P ₁ P ₂ P ₂	p ₀ P ₀ P ₂ P ₂ P ₃ P ₃
Sinvalocho M.A (A ₀)	[-]	[-]	[+]
Gamma 1R (A ₁ A ₂ A ₃)	[+]	[-]	[-]

Los genes del patógeno, en estado dicariótico, se representan como p_n (los de virulencia) y P_n (los de avirulencia) de acuerdo a las interacciones específicas con genes de reacción a plantas. El clon F0₁ es heterocigota para el gen P₀. En el caso de los genes de reacción al patógeno, en el hospedante solo se indica uno de los dos alelos pues las plantas son homocigotas. [-] indica incompatibilidad; [+] indica compatibilidad.

B. Cepas bacterianas:

Las cepas bacterianas utilizadas para el clonado de lamda gt10 fueron: NM514 (hf⁺) que da placas claras cuando lamda gt10 lleva un inserto en el gen CI y practicamente no da placa con lambda parental; L87 (hf⁻) da placas claras con lamda recombinante y placas turbias con lambda parental.

Para clonar el plásmido pcDNA II recombinante se utilizó la cepa INV1alpha F^o.

El clon A207 de gliadinas fue cedido gentilmente por el Dr. Okita.

2. Reactivos químicos :

La ³⁵S-Metionina (actividad específica 1083 Ci/mmol); la L-[3,4,5-³H(N)]-Leucina (actividad específica 142.3 Ci/mmol) y el ³²P adCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol) fueron obtenidos de New England Nuclear, USA. El lisado de

reticulocitos fue adquirido de Bethesda Research Laboratory (BRL), EEUU.

Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs (Beverly, EEUU) y Bethesda Research Laboratory.

Los sistemas para síntesis de cDNA y clonado fueron obtenidos de Amersham (Reino Unido) e In vitrogen (California, EEUU).

El resto de los reactivos finos fueron de Sigma Chemicals Co, EEUU.

PARTE EXPERIMENTAL

3. Condiciones de crecimiento e inoculación de las plántulas

Se utilizó el método de "sandwich" (Myhill & Konzac 1967) para hacer germinar semillas en hidroponia y crecer plántulas en cámaras de cría alternando períodos de 12 hs. a 20 °C y 6000 lux, con períodos de 12 hs. a 16 °C en oscuridad.

Se determinó a través de la medida de largo de primera hoja en qué momento la misma podía considerarse totalmente expandida, evitando así que efectos sobre el desarrollo asociados a la enfermedad influyan en los resultados.

Con el objeto de aislar proteínas, plántulas de 8 días fueron artificialmente inoculadas con un exceso de uredosporas de roya mezcladas con talco (1/3 p/p) en cámaras húmedas. Plántulas control, fueron "inoculadas" con talco bajo las mismas condiciones.

Para el aislamiento de RNA, se inocularon 50 plántulas de ocho días y de cada una de las líneas (crecidas en las condiciones previamente detalladas) con cada uno de los clones del patógeno por separado. A distintos tiempos después de efectuada la inoculación, las hojas se cortaron a la altura de la vaina y se determinó el peso fresco de cada muestra. Las mismas se congelaron y conservaron a -70 °C hasta el momento de ser procesadas.

4. Análisis de cambios proteicos

4.1 Sistemas de marcación de hojas "in vivo"

4.1.1. Marcación a través de raíz

A diferentes intervalos después de la inoculación, diez hojas de cada inoculación hospedante-patógeno y controles inoculados solo con talco, se pusieron a absorber a través de las raíces, una solución con aminoácido radiactivo conteniendo 100 µCi de L-[3,4,5-³H(N)]-Leucina o 20 µCi de ³⁵S-Metionina en

400 μ l de agua destilada. Se utilizaron bolsitas de polietileno para realizar este ensayo (Figura 1) haciendo pulsos de marcación de 4 a 12 hs.

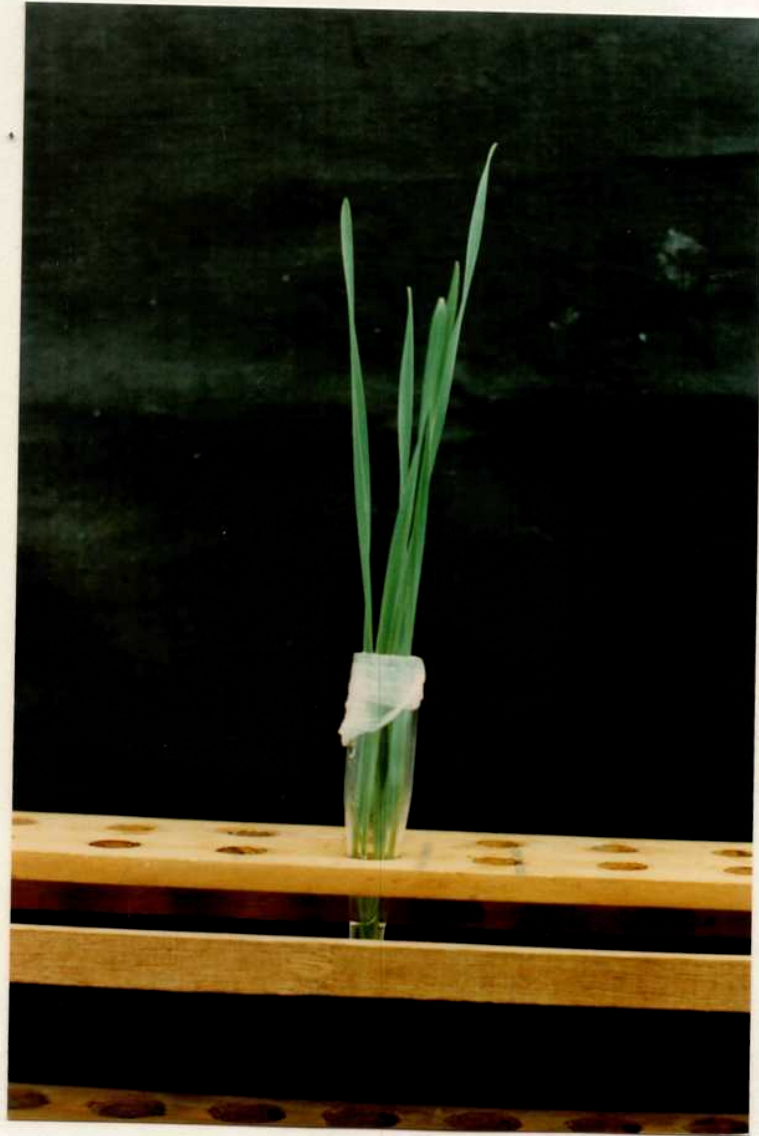
4.1.2. Marcación a través de vaina

A distintos tiempos de la infección se cortaron cinco o diez hojas, dependiendo del ensayo, y se pusieron a absorber una solución de aminoácido radiactivo conteniendo 20 μ Ci de ^{35}S -Metionina en 100 μ l de agua destilada, a través de sus vainas en tubos cónicos (Figura 2). En este caso se realizaron pulsos de marcación de 4 horas. Después de cada tratamiento, las muestras fueron pesadas y congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. De aquí en más, a menos que se explicita, todos los procedimientos fueron llevados a cabo a 4°C en un baño con hielo.

Figura 1: Sistema de marcación de proteínas sintetizadas "de novo" a través de raíz.



Figura 2: Sistema de marcación de proteínas sintetizadas "de novo" a través de vaina.



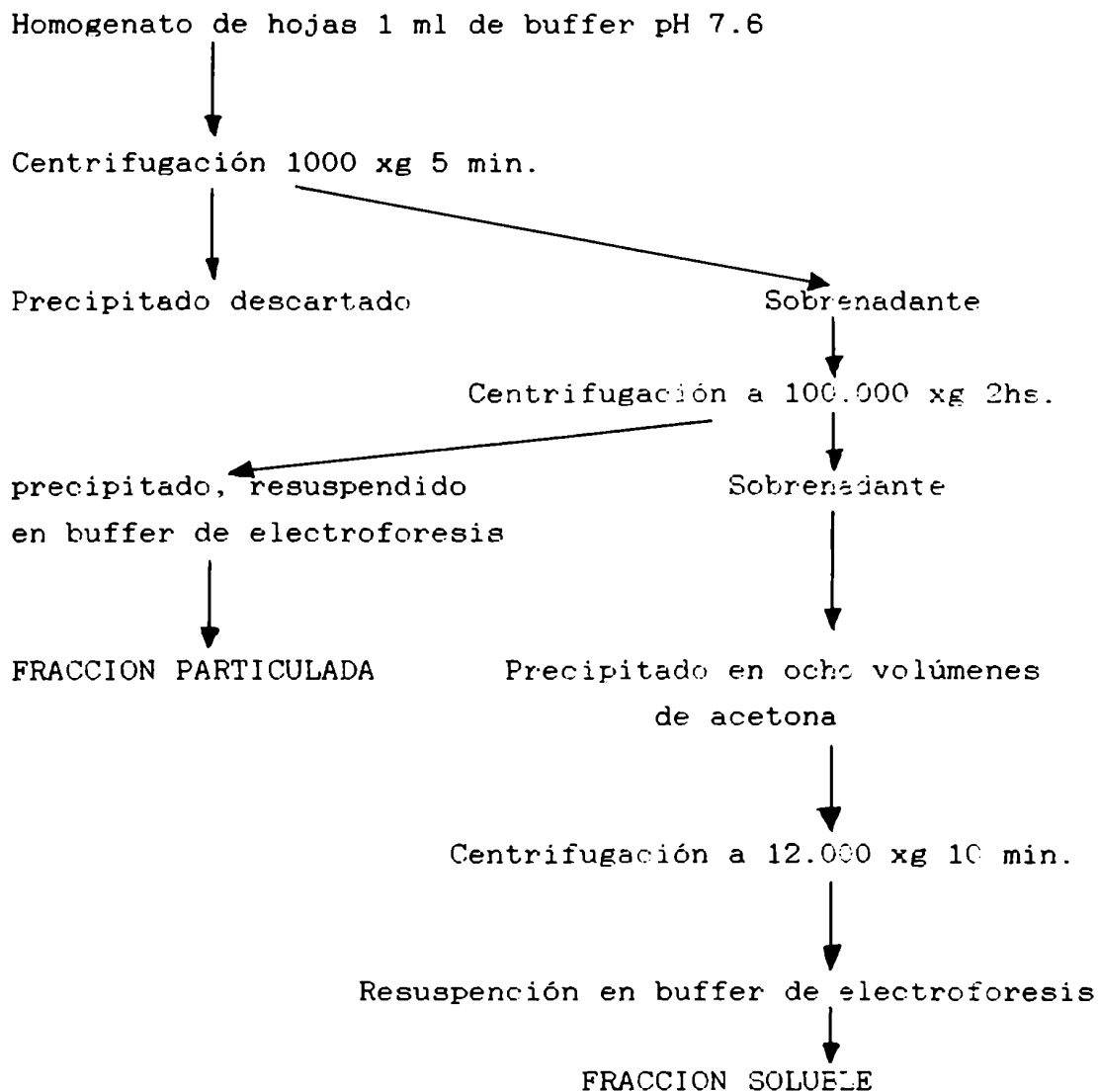
4.2. Procesamiento de muestras. Fraccionamiento

El procedimiento de extracción de proteínas de hoja fue adaptado de métodos previamente descritos (Yamoto y Tani 1982). Se llevaron a cabo homogenizaciones en mortero en presencia de nitrógeno líquido. Mientras las hojas estaban aún congeladas, se agregó 0.5 ml de buffer conteniendo Tris HCl 50 mM (pH 7,6); MgCl₂ 1 mM; β-mercaptoetanol 1mM y cloruro de fenil metil sulfónico 1 mM. Los homogenatos fueron transferidos a tubos y centrifugados a 1000 xg por 5 min. Los sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 100.000 xg en una ultracentrífuga Beckman en un rotor oscilante SW40 por 2 hs.

Los precipitados resultantes (fracción particulada o de membrana), fueron resuspendidos en buffer para muestra de electroforesis y hervidos de 2 a 3 min.

A los sobrenadantes se les agregó 8 volúmenes de acetona fría. Luego de 16 hs. a -20 °C, las proteínas precipitadas (fracción soluble), fueron recogidas por centrifugación a 12602 xg por 10 min. Los precipitados fueron resuspendidos en buffer para muestra de electroforesis y hervidos 5 min. El Esquema 1 resume el método de fraccionamiento

Esquema 1: Fraccionamiento de proteínas marcadas "in vivo" con ^{35}S -Metionina.



4.3. Medición de la radioactividad incorporada

Se pipetearon alícuotas del 1º homogenato en pequeños cuadrados de papel Whatman 3 MM, se hirvieron 10 min. en TCA 10 % y se lavaron con TCA 10 % frío, luego con alcohol 96 % (v/v) y finalmente con acetona. Luego de secar los papeles bajo una lámpara incandescente, se los puso en viales, se agregó líquido de centelleo y se midió la radioactividad incorporada a las proteínas en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard

3330). Lo mismo se hizo para medir la cantidad incorporada en cada una de las fracciones proteicas y así poder sembrar una cantidad de radiactividad comparable en cada calle del gel.

4.4. Electroforesis de proteínas

Se probaron dos métodos de electroforesis en geles desnaturalizantes.

4.4.1. Método de Chua y Bennoun (1975). Se hicieron electroforesis en geles al 12,5%. El gel separador contenía: 14,8 ml de agua; 16,6 ml de una solución de Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8); 8 ml de buffer Tris-HCl 2 M (pH 9,18); 0,4 ml 10% SDS; 160 µl de persulfato de amonio; 20 µl de TEMED. El gel espaciador contenía 5,3 ml de agua; 2ml de solución de Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8); 2,5 ml de buffer Tris-sulfato 0,2 M (pH6,1); 100 µl de persulfato de amonio; 16 µl de TEMED. El buffer de corrida del reservorio inferior contenía Tris-HCl 0,01 M (pH 9,18). El buffer del reservorio superior contenía: Tris borato (pH8,64).

El buffer de muestra utilizado era: Tris-HCl 0,2 M pH9, EDTA 10 mM, sacarosa 0,5 M, 0,01 % azul de bromofenol, β-Mercaptoetanol 50mM, 5 % SDS.

4.4.2. Método de Laemli modificado por Altman et al. (1983). Se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %.

El gel separador contenía 20 ml de agua; 12,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 0,5 ml de SDS al 10 %; 200 µl de persulfato de amonio al 10 %; 17 ml de una solución de Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8); 27 µl de TEMED. El gel espaciador contenía 6 ml de agua; 2,50 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,1 ml de SDS al 10 %; 100 µl de persulfato de amonio al 10 %; 1,25 ml de la misma solución de Acrilamida-Bisacrilamida y 16 µl de TEMED.

El buffer de corrida contenían glicina, 1,8 g de Tris base, y 0,6 g de SDS.

La composición del buffer de muestras para electroforesis 2x

fue la siguiente: 0,5 ml de agua; 1,75 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,5 ml de β mercaptoetanol; 0,25 ml de azul de bromofenol al 0,05%. Luego se le agrega 1 volumen de SDS al 10% y 100 μ l de glicerol al 75%.

En ambos métodos se sembraron 30000 cpm (insolubles en TCA) en cada calle.

Como marcador de peso molecular, tanto en los geles de proteínas sintetizadas "in vivo" como en los geles de proteínas sintetizadas "in vitro" se utilizaron estándares de Sigma (MW-SDS-70L) y de BioRad (161-0305). El primero contenía albúmina (66000 D), ovoalbúmina (45000 D), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (36000 D), anhidrasa carbónica (29000 D), tripsinógeno (24000 D), inhibidor de tripsina (21500 D), α lactoalbúmina (14200 D). El estándar de BioRad contenía:

fosforilasa b (97400 D), Seroalbumina bovina (66000 D), ovoalbúmina (45000 D), anhidrasa carbónica (31000 D), inhibidor de tripsina (21500 D) y lisozima (14000 D).

La corrida se realizó a 20 mA durante 5 hs hasta que el frente de azul de bromofenol llegara al extremo del gel.

Los geles fueron fijados con TCA 12 % durante media hora, tratados con alcohol 50 % primero y luego se les hizo tratamiento para fluorografía.

4.5. Tratamiento para fluorografía

Se probaron dos métodos de fluorografía:

4.5.1 Tratamiento con Salicilato de Sodio: después de fijado el gel se lavó con 50% etanol varias veces para neutralizarlo. Se realizó luego incubación con Salicilato de Sodio 1 M durante 20 min a temperatura ambiente.

4.5.2 Tratamiento con PPO-DMSO: se siguió el protocolo de Bonner et al. (1974). Se efectuaron tres lavados de 30 min. cada uno con agitación continua con Dimetil Sulfoxido (DMSO). Luego el gel fue tratado con una solución conteniendo 20% de

2,5-Difeniloxazol (PPO) en Dimetil Sulfoxido (p/p) durante tres horas. Se dejó hidratar dos horas en agua previamente al secado.

Después del tratamiento de fluorografía los geles se secaron y se expusieron a films autoradiográficos Agfa-Gevaert o Kodak X-Omat por lapsos de 1 a 5 semanas a -70°C con pantallas intensificadoras Cronex lightning plus o Kodak X-Omat dentro de un cassette apropiado.

4.6 Extracción e identificación de proteínas ácidas:

A distintos tiempos después de la infección, se cortaron diez hojas de las interacciones Gamma 1R-FO₁ y Sinvalocho M.A.-FO₁ así como de los controles de ambas líneas inoculados solo con talco. Las hojas se congelaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Las muestras se procesaron según método de Mauch and Staehelin (1989). Las hojas se homogenizaron en mortero con nitrógeno líquido. Se adicionaron 4 ml de buffer conteniendo citrato de sodio 0,1 M, pH 4.6, EDTA 5 mM, ascorbato de sodio 10 mM, fluoruro de fenil-metil sulfónico 1 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. El extracto se centrifugó a 20.000 xg por 20 minutos y las proteínas del sobrenadante se precipitaron por adición de sulfato de amonio a 95% de saturación. Después de centrifugar a 20.000 xg por 20 minutos el precipitado se resuspendió en Tris-HCL 10 mM, pH 7.5 y se precipitaron con 8 volúmenes de acetona -20°C durante 16 horas. Las proteínas se centrifugaron a 12.000 xg por 10 minutos se secaron y resuspendieron en buffer de muestra para electroforesis como se describió para las proteínas marcadas con ^{35}S -Metionina. Las muestras se corrieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE según metodología ya descripta. Las proteínas se visualizaron con Azul brillante de Coomassie R.

5. Análisis de cambios a nivel de RNA:

5.1. Extracción de RNA

Se realizó en base a la técnica de Taylor et al. (1982).

Se homogenizaron las hojas en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se transfirió a un vaso de precipitados, y se agregó (por gramo de tejido) 1 ml Tris HCl 2 M pH 8, 2 ml EDTA 0,5 M, 1 ml SDS 20%. Se agregó 1/2 vol de fenol por gr. de tejido, previamente equilibrado en TE, se agitó durante media hora y se agregó 1/2 vol de cloroformo agitando durante 10 minutos más. Se pasó a un tubo de centrifuga, se centrifugó 10 min. a 12600 xg, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se la extrajo esta vez con 1/2 vol de fenol:cloroformo (1:1, v/v). Se realizaron dos extracciones más pero esta vez con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Luego se agregó LiCl 6 M hasta una concentración final de 2,5 M. Se dejó toda la noche precipitando a -6 °C. Al día siguiente se centrifugó 15 min. a 12602xg, se dejó secar el precipitado al aire, se resuspendió en agua destilada tratada con dietilpírocarbonato y se precipitó con acetato de sodio y etanol. Se lavó con alcohol 70% y se resuspendió en TE (TrisCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

5.2. Electroforesis de RNA

El RNA se corrió en un gel desnaturalizante con formaldehído (Maniatis et al. 1982). Se preparó un gel de agarosa al 1,5% de la siguiente manera:

Se disolvieron, calentando, 1,5 g de agarosa en 73 ml de agua destilada. Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta 60°C y se agregaron 10 ml de buffer MOPS 10x (MOPS 0.2 M; Acetato de sodio 0.05 M; EDTA 0.01 M), 16,2 ml de 37% formaldehído, y Bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml.

La muestra se preparó de la siguiente manera:

Se disolvió el RNA en un volumen apropiado de 50% formamida,

6% formaldehído y MOPS 1x. Se incubó a 65°C por 2 min y se sembraron 10 µg en cada calle.

La corrida se realizó en buffer MOPS 1x durante 5 hs a un voltaje constante de 50 Voltios.

5.3 Traducción de RNA mensajero

Estos ensayos se realizaron utilizando un lisado de reticulocitos de conejo comercial. Se partió de 3 µg de RNA total de todas las combinaciones H-P en estudio y de las plántulas inoculadas solamente con talco.

La reacción se efectuó con

1,3 µl	2 M Acetato de potasio pH 7
1,0 µl	³⁵ S-Metionina (10 µCi)
3,0 µl	mezcla de aminoácidos
1,0 µl	RNA (3µg/µl)
10,0 µl	lisado
13,7 µl	H ₂ O

30,0 µl	

Se incubaron 2 hs. a 30 °C. Se incluyó un mRNA de globina como control y un tratamiento control negativo, sin mRNA.

5.4. Electroforesis de las proteínas sintetizadas "in vitro"

Los productos obtenidos de la traducción "in vitro" se corrieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida, se fijaron, se trataron con 20 % 2,5-difeniloxazol, se secaron y se expusieron como ya se describiera para las proteínas sintetizadas "in vivo".

6. Análisis de la organización génica

6.1. Extracción y electroforesis de proteínas de reserva

Debido a que el proteínograma de un extracto total de proteínas del grano, obtenido mediante una separación electroforética en geles de poliacrilamida es complejo, con gran superposición de bandas, se propusieron algunas modificaciones en los métodos de extracción y en la preparación de geles, con el objeto de mejorar la separación de los componentes proteicos en estudio.

Se tomaron tres granos de cada una de las líneas, Sinvalocho M.A. y Gamma 1R, se homogeneizaron en mortero y se transvasaron a tubos de 1,8 ml. La extracción de gliadinas y glutelinas se realizó con 0,3 ml/grano de buffer compuesto por 50% propanol, 2-mercaptoetanol al 2% y ácido acético al 1% (Thompson et al) durante una noche a 60°C. Se centrifugó y al sobrenadante se le agregó 100 µl de iodoacetamida neutralizando con NaOH. Se precipitó con NaCl 2M, agregando Tris pH 8 hasta una concentración final Tris-cloruro de sodio 0,94 M. Se mantuvo a 4°C, se centrifugó a 5000 g por 10 min. y el precipitado se lavó con agua y se resuspendió en buffer. El precipitado de la extracción propanol-acética se reextrajo de igual forma, se lavó con propanol 50% y se resuspendió también en buffer.

Se realizaron geles desnaturalizantes al 12 % y geles en gradiente de 7,5 a 15 %, de poliacrilamida estos últimos para mejorar la resolución de las gliadinas de menor peso molecular sin perder la buena definición de la fracción de glutelinas. Se siguió el protocolo de Chua y Bennoun (1975) descripto anteriormente.

6.2. Extracción y purificación de DNA :

A partir de plántulas de 10 días de edad de las líneas Sinvalocho M.A. y Gamma 1R, crecidas en cámara de cría (18-20°C, 12 hs de fotoperiodo y 6000 lux) se extrajo DNA según protocolo

de Taylor et al (1982). Se siguieron los mismos pasos descritos en la extracción de RNA hasta la extracción con cloroformo-isoamílico. Luego se añadió a la fase acuosa 3 vol de etanol frío y se recogió el DNA enrollándolo en una varilla. Se resuspendió en TE.

La purificación se llevó a cabo en un gradiente de CsCl en tubos con 4,5 ml de TE, CsCl a una concentración final de 0,95 gr/ml, y Bromuro de etidio a una concentración final de 600 µg/ml. La corrida se hizo en una ultracentrífuga Beckman durante 36 hs a 40.000 rpm utilizando un rotor oscilante (swinging) SW 65.

Se colectó el DNA y, para eliminar el Bromuro de etidio se añadió 1 Vol de 1-butanol saturado en agua, se agitó vigorosamente, se centrifugó a 1.500 g por 3' para separar las dos fases y se transfirió la fase acuosa inferior a otro tubo. Esto se repitió hasta que desapareció el color, debido al Bromuro de etidio, de la fase acuosa.

Se corrió en un gel de agarosa 0,8 % p/v en TAE 1x (0,04 M Tris-acetato, 0,002 M EDTA) para chequear su integridad, usando como buffer de corrida TAE 1x.

6.3. Restricción con endonucleasas y Southern blot:

Se digirió 10 µg de DNA de las dos variedades por separado con 0,5 µl de dos enzimas de restricción, Bam HI y Hind III (10 U/µl) también por separado, 2 µl del buffer adecuado (ClNa 100 mM para Bam HI y NaCl 60 mM para Hind III), y agua hasta un volumen final de 20 µl. Se incubó 2 hs a 37 °C.

Se corrió un gel de agarosa al 0,8 % en TAE 1 x durante toda la noche a 20 voltios, usando como buffer de corrida TAE 1 x.

Se sembró DNA de fago lambda cortado con Hind III como marcador de peso molecular.

El DNA se desnaturalizó tratando al gel con solución desnaturaizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) y luego con solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,4, NaCl 3 M).

Más tarde el gel fue transferido a nitrocelulosa por "Southern blot" en 20x SSC (NaCl 3 M, citrato de trisodio 0,3 M)

durante toda la noche (Maniatis et al. 1982).

Se horneó el filtro a 80 °C por 2 hs. en un secador de geles.

6.4 Extracción de plásmidos y preparación de sonda:

Se extrajeron plásmidos a partir del clon Az07 de α gliadinas (Okita et al 1982) para luego ser marcados por el método de iniciación al azar ("random priming") y usado como sonda para la hibridización.

La extracción se hizo según el método de Birnboim (Birnboim H.C. 1987) modificado. Brevemente:

Se cultivaron las bacterias en LB con ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml durante una noche a 37 °C con agitación. Se centrifugaron 1,5 ml de cultivo en un tubo eppendorf para bajar las bacterias. Se resuspendió en 100 μ l de TEG (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, TrisCl 25 mM pH 8, con 40 μ g de lisozima) y se dejó a 0°C durante 5 min. Se agregan 200 μ l de una solución alcalina (NaOH 0,2 M, 1 % SDS). Se mezcló bien y se dejó a 0 °C durante 5 min. Luego se agregó 150 μ l de solución de alta sal (KAc 3 M, ácido fórmico 1,8 M) y se dejó a 0 °C 15 min. Se centrifugó en una microcentrifuga 10 min. y se transfirió el sobrenadante (aprox 350 μ l) a otro tubo. Se agregó 900 μ l de etanol frío y se dejó 30 min. a -20 °C. Se centrifugó y se secó el pelet al vacío. Se resuspendió el precipitado en 100 μ l de Mops-acetato (0,1 M NaAc, 0,05 M Mops, pH 8) y se precipitó con 200 μ l de etanol 30 min. a -20 °C. Se centrifugó nuevamente, se secó el precipitado y se resuspendió en 40 μ l de TE.

El marcado por iniciación al azar ("random priming") se realizó de la siguiente manera:

DNA plasmídico	1	μ l (aprox 0,5 μ g)
5 x buffer	4	μ l
10 x dNTPs	2	μ l
α - ³² P dCTP	12	μ l (120 μ Ci)

Se mezcló suavemente y se agregó 1 U/ μ g DNA de DNA Polimerasa 1.

Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 hs.

El buffer utilizado fue OLB, que contiene (el 5 x): 500 mM PIPES pH 6,6; 25 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 1,25 mg/ml hexanucleótidos sintéticos que funcionan como iniciadores al azar; 1 mg/ml Seroalbumina bobina.

Se paró la reacción con 2 μ l de EDTA 0,5 M en 100 μ l de agua.

Medición de radiactividad incorporada.

Se tomó una alícuota de 1 μ l antes y otra después de la incubación y se precipitaron con 500 μ l de 5% TCA 1% PPi con la adición de 100 μ g de tRNA de levadura. Se dejó a -20 °C durante 10 min., se filtró sobre papel de fibra de vidrio al vacío. Se lavó varias veces con 5% TCA, se secó bajo lámpara, se añadió líquido de centelleo y se midió radiactividad. La primera medición corresponde a las cuentas iniciales precipitables por TCA ó TCA iniciales.

La segunda medición corresponde a cuentas precipitables por TCA incorporadas finalmente, o TCA finales. Junto con la segunda alícuota se tomó 1 μ l de la mezcla que se colocó sobre un círculo de papel Whatman 3 MM, se secó y se contó igual que antes. Esta medición será la de cuentas totales (CT).

Se precipitó luego la sonda dos veces con acetato de amonio 2 M final y 2,5 volúmenes de etanol para separar los nucleótidos no incorporados y se resuspendió en 100 μ l de TE.

El % de incorporación se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{TCA finales} - \text{TCA iniciales}}{\text{CT}} \times 100.$$

CT

La actividad específica de la sonda se calculó de la siguiente manera:

Actividad específica = TCA totales / μg DNA

TCA totales = TCA final \times Vol de resuspensión (100 μl).

6.5. Hibridación, exposición y revelado:

La pre-hibridación y la hibridación se efectuaron en:

2 x SSC

0.2 % BSA

0.2 % Ficoll 400

0.2 % Polivinilpirrolidona 40

0.1 % SDS

Se pre-hibridó durante 6 horas a 67 °C. Luego se incorporó la sonda previamente desnaturalizada (2 min. a 100 °C). Se hibridó durante 16 hs. a la misma temperatura. El filtro fue luego lavado sucesivamente en 2 x SSC; 1 x SSC; 0.3 x SSC ; 0.1 x SSC, todos en 0.1 % SDS a 67 °C, y expuesto luego a película autoradiográfica Kodak X-Omat a -70°C con cassettes conteniendo placas intensificadoras.

7. Construcción de colecciones de cDNA en lambda gt10

Se construyó una colección de cDNA a partir de mRNA de Gamma 1R-FO₁ y otra a partir de Sinvalocho-FO₁ ambos del tercer día del proceso de infección.

7.1 Aislamiento de RNA mensajero a partir de RNA total

Para aislar RNA mensajero se utilizaron dos métodos:

- Columna de oligo dT celulosa
- Papel de poly U. Se utilizó papel de afinidad para RNA mensajero Hybond-mAP de Amersham.

En ambos caso se partió de 500 μg de RNA total para obtener alrededor de 10 μg de mRNA.

En el caso de la columna de oligo dT celulosa se siguió el protocolo de Maniatis et al. (1982).

Cuando se aisló por papel de poly U, se procedió de la siguiente manera.

- Se humedeció el papel de poly-U con NaCl 0,5M (20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), se dejó secar completamente por 10 min.

- Se desnaturalizó el RNA resuspendido en agua esteril a 65° durante 5 min. Inmediatamente se colocó la muestra en hielo adicionando NaCl a una concentración final de 0,5 M.

- Se adicionó el RNA sobre el papel de poly U (en un volumen de 20 μl) dejando absorber durante 2 min. sobre Parafilm.

- Se dejó secar el papel de poly U sobre papel de filtro durante 2 min.

- Se transfirió el papel a un tubo estéril y se lavó con 0,5 M NaCl (por lo menos 5 ml / cm^2) por 5 min., dos veces.

- Se lavó con 70% etanol (5ml/ cm^2) por 2 min. con agitación continua para remover sales.

- Se dejó secar sobre papel de filtro.

- Se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se adicionó 400 μl de agua estéril.

- Se calentó a 70°C por 5 min. Este paso libera alrededor del 95% del poly A+ mRNA.

- Se agitó y se pasó la solución a un nuevo tubo.

- Se precipitó el RNA mensajero libre de sales con Acetato 0,3 M de sodio y 2,5 volúmenes de etanol.

7.2 Síntesis de cDNA doble cadena a partir de mRNA

A partir de poli A+ obtenido como se describió anteriormente, se construyó cDNA utilizando el sistema de síntesis de Amersham (Reino Unido). El esquema 1 resume los pasos de la síntesis. La síntesis de la primera cadena de cDNA se efectuó con transcriptasa reversa utilizando oligo dT como primer. La reacción se efectuó de la siguiente forma:

buffer 5x 1º cadena	4 µl
Pirofosfato de sodio	1 µl
Inhibidor de RNAsas (HPRI)	1 µl
Mezcla de deoxinucleótidos trifosfato	2 µl
Oligo dT	1 µl
32P dCTP	2 µl *
mRNA	5 µl
Agua	4 µl

Vol. final	20 µl

Se adicionaron 20 unidades de transcriptasa reversa y se incubó a 42°C durante 40 min.

La segunda cadena se construyó con el método de RNasa H y DNA polimerasa 1. La mezcla de reacción contenía:

Mezcla de reacción 1º cadena	20 µl
Buffer 2º cadena	37,5 µl
Ribonucleasa de <u>E.coli</u>	0.8 unidades
DNA polimerasa I de <u>E.coli</u>	23 unidades
Agua	cantidad necesaria para 100 µl

La reacción se incubó a 12°C por 60 min. y luego a 22°C por 60 min. Para inactivar las enzimas se incubó a 70°C por 10 min.

Se obtuvieron los extremos romos tratando con 2 unidades de T4 polimerasa e incubando 10 min. a 37°C. Se detuvo la reacción con 4 µl de EDTA 0,25 M pH 8.

El cDNA doble cadena se purificó por fenol/cloroformo y se precipitó con acetato de amonio y etanol.

7.3 Electroforesis en gel alcalino

Una alícuota del cDNA se corrió en gel alcalino para comprobar integridad y tamaño del mismo. Se preparó una solución de agarosa 0,8% (p/v) en NaCl 0,05 M y EDTA 0,001 M. Las muestras se diluyeron en una solución de NaOH 250 mM, EDTA 5 mM,

Ficoll 400 2,5% y verde de bromocresol 0,025%. El gel se equilibró durante 30 min. en una solución de NaOH y EDTA 1 mM. La electroforesis se efectuó a 30 voltios durante 6 hs. El gel fue luego secado y expuesto a películas KODAK X-Omat con pantallas amplificadoras a -70°C .

7.4 Fraccionamiento del cDNA

El cDNA obtenido se fraccionó por peso molecular en columna de Bio-Gel A-50m equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 100 mM y EDTA 1 mM durante 24 hs. a un flujo de 1 ml/h. Se siguió el protocolo detallado por Huynh et al. (1985). Se recogieron 15 fracciones de 15 μl c/u y fueron leídas en contador de centelleo líquido. Una alícuota de cada una de las fracciones obtenidas se corrió en gel alcalino. Se unieron las dos fracciones de mayor peso molecular y las dos fracciones siguientes en peso molecular. Estas fracciones se precipitaron con acetato de sodio y etanol.

7.5 Cuantificación del cDNA doble cadena obtenido

La cantidad de cDNA obtenida se calculó de la siguiente forma:

$$\text{cDNA ng} = 2^a \times 350^b \times 4^c \text{ Ang}$$

$$A = \% \text{ de } \alpha \text{ } ^{32}\text{dCTP} \text{ incorporado} \times Y \text{ nmoles}$$

Y = Cantidad de dCTP sin marcar en la mezcla de segunda cadena.

c: nº de deoxinucleótidos incorporados

b: peso de un nanomol de dNMP

a: dos cadenas de cDNA sintetizadas.

7.6 Clonado del cDNA

Se siguió el protocolo del sistema provisto por Amersham de clonado en lambda gt10.

Metilación de sitios Eco RI internos en el cDNA. Se utilizaron 20 unidades de Eco RI metilasa y se incubó durante 60 min. a 37°C. Luego se incubó a 70°C por 10 min.

- Adición de extremos cohesivos Eco RI al cDNA. Se efectuó con 1 µg de extremos y 5 unidades de DNA ligasa de T4 por 10 min. Se detuvo la reacción incubando 10 min. a 70°C.

- Digestión con Eco RI del cDNA con extremos unidos. Se efectuó con 100 unidades de Eco RI durante 5 hs. a 37°C.

- Separación de los extremos Eco RI no unidos del cDNA. Se utilizó una columna provista por el sistema de Amersham. Se equilibró en buffer STE y se recogió la muestra de cDNA en 10 fracciones. Se midió la radiactividad (Cherencov) de todas las fracciones recogidas en contador de centelleo líquido. Se tomaron las dos fracciones de mayor radiactividad separando así los extremos libres que eluyen en las últimas fracciones. Se precipitó el cDNA con extremos Eco RI cohesivos con acetato de sodio y etanol. Se resuspendió el cDNA en una concentración de 100 µg/ml.

- Ligamiento del cDNA a los brazos de lambda gt10.

El cDNA obtenido se ligó con 1 µg de brazos de lambda gt10 con 2,5 unidades de DNA ligasa T4. Como control negativo se ligaron los brazos de lambda sin adición de inserto. La reacción se incubó a 15°C durante 16-20 hs. La mezcla ligada se precipitó con acetato de sodio y etanol.

- Empaquetamiento de la mezcla de ligamiento.

Se utilizó un extracto de empaquetamiento comercial de Amersham.

La incubación se efectuó a 20 °C durante 120 min.

Se adicionó 0,5 ml de buffer SM y 10 µl de cloroformo. Se guardó a 4°C.

- Titulación de la colección de cDNA.

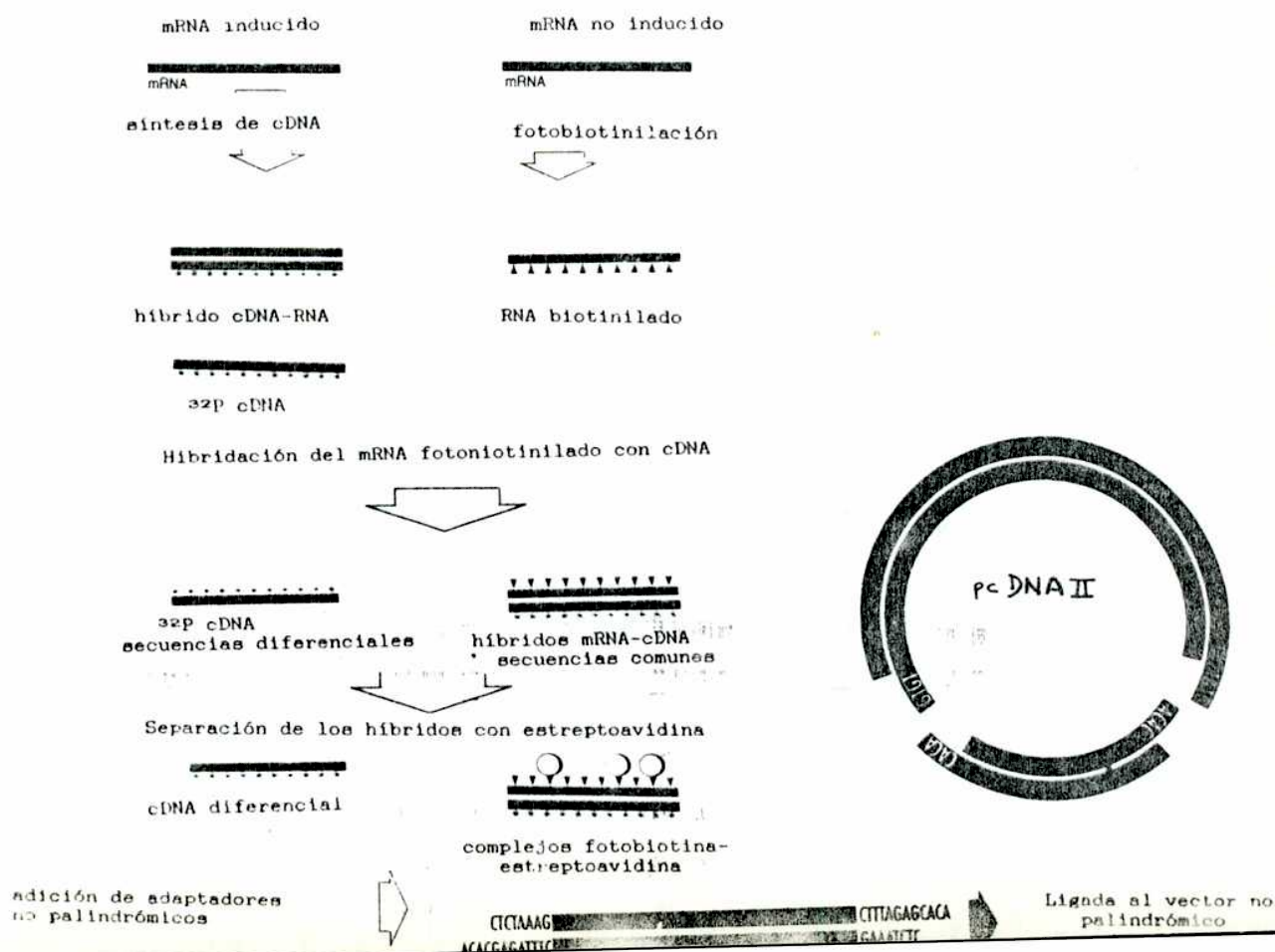
100 μ l de distintas diluciones de la suspensión conteniendo fagos recombinantes (10^2 a 10^4) se incubaron con 100 μ l de células NM514 (hfl⁺) y 100 μ l de otras diluciones (10^4 a 10^8), con la cepa L87. La adsorción se efectuó a 37°C durante 15 min.

Se plaqueó con agarosa diluida ("top"-agarosa) sobre cajas de Petri (de 9 y 13 cm de diámetro).

Los fagos recombinantes se reconocieron por la aparición de placas claras al adsorber con NM514.

8. Construcción de una colección de cDNA diferencial

Una alternativa a la estrategia anteriormente mencionada, es la construcción de una colección de cDNA diferencial. En este caso el cDNA correspondiente al RNA mensajero inducido en el sistema Gamma 1R-FO₁ se arresta con RNA mensajero de un sistema no inducido (Gamma 1R-Testigo). Este último RNA es biotinilado de forma tal que después del arresto los híbridos cDNA-RNA biotinilados pueden ser complejados con estreptoavidina, dejando libres los cDNAs específicos del sistema inducido. El siguiente esquema resume los pasos comprendidos por este protocolo.



Se utilizó un sistema de in vitro gen para la construcción de esta colección diferencial.

8.1 Fotobiotinilación:

20 μg del RNA mensajero no inducido (Gamma 1R testigo) se resuspendieron en 30 μl de agua estéril fueron biotinilados según protocolo de "In vitro Gen". Se utilizó fotobiotina provista por el sistema en una concentración final de 1 mg/ml . El tubo conteniendo el mRNA con la fotobiotina se colocó en hielo y se expuso a una lámpara de 500 Watts durante 20 min. a una distancia de 10 cm y con un sistema de refrigeración para impedir el calentamiento de la muestra. Se adicionó Tris base 0,1M pH9 y se llevó a un volumen final de 200 μl . Se extrajo luego con un volumen de 2-butanol. Se repitió la extracción hasta que la fase butanólica apareció clara. Se precipitó con acetato de sodio y etanol. Se centrifugó y el precipitado apareció anaranjado lo que representa un indicio de buena biotinilación. Se resuspendió en 30 μl de agua estéril. Se repitió el ciclo de biotinilación una vez más.

8.2. Síntesis de cDNA 1^o cadena de Gamma 1R-FO₁

Se siguió un protocolo similar al descrito anteriormente sólo que se partió de 2-3 μg de mRNA de Gamma 1R-FO₁. El mRNA se trató con 2 mM MeHg durante 5 min. a temperatura ambiente para desnaturalizar el RNA, previo a la reacción con transcriptasa reversa. La misma se incubó durante 60 min. a 42 °C. Se detuvo la reacción con EDTA y se adicionó 5 μg de tRNA.

Se efectuó una extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con acetato de amonio y etanol. El cDNA obtenido se resuspendió en 50 μl de 0.5 M NaOH y se incubó a 55°C 15 min. Se precipitó con acetato de sodio y etanol.

8.3. Hibridación sustractiva

Se adicionó el mRNA biotinilado al cDNA resuspendido en agua estéril y se precipitaron con acetato de sodio y etanol. Se resuspendió en 10 μ l de agua estéril, se adicionó 10 μ l de buffer de hibridación 2x y se incubó 1 min. a 100 °C. Luego se incubó a 68 °C 24 hs. seguido de una incubación a 55 °C durante 5 min.

Posteriormente se llevó a hielo y se adicionó 30 μ l de buffer Hepes/ EDTA seguido por 10 μ l de estreptoavidina. Se incubó 10 min. a temperatura ambiente y se realizó una extracción con fenol/cloroformo. Se reextrajo la fase orgánica y se unieron ambas fases acuosas. Se repitió la incubación con estreptoavidina. Finalmente la fase acuosa se precipitó con acetato de sodio y etanol.

8.4. Síntesis de cDNA 2º cadena

El cDNA correspondiente al mRNA de Gamma 1R-FO₁ previamente sustraído con el mRNA no inducido (Gamma 1R control) se resuspendió en 53 μ l de agua estéril. Se adicionaron 2 μ l de dNTPs 25 mM; 5 μ l de una mezcla de hexanucleótidos; 167,5 μ l de buffer de 2º cadena; 12,5 μ l de BSA 1 mg/ml; 5 μ l de 10 mM NAD⁺; 5 μ l de DNA polimerasa I. Se incubó a 15 °C durante 90 min. y luego otros 30 min. a temperatura ambiente. La reacción se detuvo incubando a 70°C por 10 min. Se adicionó 1 μ l de DNA polimerasa T4 y se incubó a temperatura ambiente 30 min. Se efectuó una extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con acetato de amonio y etanol.

8.5. Clonado de cDNA diferencial

8.5.1 Adición de adaptadores

Se utilizaron adaptadores no palindrómicos fosforilados provistos en el sistema In Vitro Gen, con un extremo "CACAA" protruyente en 3' que permite la ligada al vector pcDNAII que se utilizó en el clonado (Esquema II).

Se resuspendió el cDNA doble cadena en 13 μ l de agua estéril y se adicionaron 2 μ l de buffer de ligamiento, 3 μ l de adaptadores BstX I y 2 μ l de T4 DNA ligasa. Se incubó a 15 °C durante 12 hs. La reacción se detuvo con 1 μ l de 0,5 M EDTA.

El cDNA unido a los adaptadores se trató con RNasa durante 10 min. a 37 °C.

8.5.2 Selección del cDNA por tamaño

Se seleccionó el cDNA para ser clonado en gel de agarosa. Al mismo tiempo se separó el cDNA de los adaptadores que estaban en exceso. El gel se preparó al 1% en buffer Tris-acético. Paralelamente a la muestra de cDNA se corrió un marcador de peso molecular para facilitar la selección del cDNA por tamaño. El gel se corrió a 5 voltios/cm hasta que el colorante (Azul de Bromofenol) hubo migrado entre 4 y 6 cm. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio protegido de la luz. Tomando como referencia la migración del marcador de peso molecular se cortó el fragmento de agarosa conteniendo cDNAs con un tamaño mínimo de 700 kb). El cDNA seleccionado se electroeluyó durante 3 hs. a 10 voltios/cm en 1/4x buffer Tris acético. Una vez electroeluido el cDNA se resuspendió en el mismo buffer, se agregó 1 μ l de 5 mg/ml de tRNA para favorecer la precipitación, se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con acetato de amonio y etanol.

8.5.3 Ligada del cDNA al vector pcDNA II

El vector utilizado es un pcDNA II construido por In Vitro Gen, cortado en BstX I (Esquema II). Es un vector no palindrómico y por lo tanto no es necesario fosfatasearlo, evitando algunas de las desventajas de esas metodología como la aparición de un número considerable de falsos positivos.

El cDNA se resuspendió en 10 μ l de agua estéril. Se adicionaron 3,5 μ l de buffer 10x de ligamiento; 7 μ l de una dilución 1/10 del vector comercial pcDNA II y 0,5 μ l de T4 ligasa en un volumen final de 35 μ l.

Simultáneamente se efectuó un control positivo de ligada con un inserto control de 350 pb con 50 ng de inserto, 5 μ l del vector diluido 1/10 en un volumen final de 10 μ l. Como control negativo se religó el vector pcDNA II cortado con BstX I.

Las muestras se incubaron a 15°C durante 12 hs.

8.5.4. Transformación

Con los productos del ligamiento se procedió a realizar una transformación en pequeña escala para determinar eficiencia de transformación y evaluar el número de clones recombinantes.

1 μ l de cada uno de los productos del ligamiento y 1 μ l de plásmido SC control (conteniendo 10 pg/ μ l) se pusieron en tubos tipo "Falcon" conteniendo 2 μ l de β mercaptoetanol 0,5 M y 40 μ l de células competentes INVaF'. Se dejó en hielo 30 min. Se incubó 60 seg. a 42 °C e inmediatamente se puso en hielo 2 min. Se adicionó medio SOC y se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. Se plaqueó con "top" agarosa conteniendo 1 mM final de IPTG y 1 mg de X-Gal sobre cajas de Petri (de 9 cm de diámetro) con LB agar con 100 μ g/ml de ampicilina. El número de recombinantes se determinó evaluando el número de colonias blancas. El porcentaje de religada del vector fue de alrededor del 20 % evidenciado por el número de colonias azules.

En base a los datos obtenidos se encaró una transformación a gran escala siguiendo el mismo protocolo pero utilizando 1 ml de células, todo el resto de la mezcla de ligamiento y 50 μ l de β mercaptoetanol. La incubación a 37°C se efectuó con 9 ml de medio SOC. Después de 1 hora se centrifugó 5 min. a 3000 xg. Se resuspendió el precipitado en 2,5 ml de medio. La colección de cDNA se guardó en glicerol a una concentración final 15 %. Entre 100 y 400 μ l de la misma se plaguaron en cajas de Petri con LB agar con ampicilina como se describió anteriormente. Se incubaron las placas a 37°C por 24 hs.

9. Identificación de clones diferenciales

Para determinar si las colonias recombinantes eran realmente

clones diferenciales o si por lo contrario se trata de clones provenientes de cDNA presentes en ambas poblaciones de Gamma 1R-FO₁ y Gamma 1R control y que no han sido bien arrestados, se levantaron filtros réplica de los clones recombinantes. Para ello se siguió el protocolo de Maniatis (1990) sin modificaciones.

Para la búsqueda diferencial se procedió a la hibridación de los filtros réplica con dos sondas marcadas radiactivamente: una a partir del mRNA mensajero de Gamma 1R-FO₁ y otro a partir de Gamma 1R testigo, ambos del día 5 posterior a la inoculación.

La reacción de marcación de los cDNAs se realizó de la siguiente forma:

10 µl de mRNA en agua estéril

0,5 µl de 0,1 M MeHgOH

Se incubó 5 min. a temperatura ambiente. Se agrego 1,25 µl de 0,7 M β mercaptoetanol. Se colocó en hielo y se adicionó:

0,2 µl de oligo dT (1 mg/ml)

0,5 µl de inhibidor de RNasa

5 µl de buffer RT

5 µl de ³²P dCTP (5 µCi de actividad específica 3000Ci/mmol)

1 µl de dNTPs (150 µM)

1 µl de transcriptasa reversa

Se incubó la mezcla de reacción por 40 min a 42°C. Se adicionó 1 µl de 25 mM dCTP y se incubó otros 20 min. a 42°C.

Se paró la reacción con 2 µl de EDTA y se hidrolizó el mRNA templado con NaOH a una concentración de 0.5 M a 55°C por 15 min. Luego se neutralizó con un volumen de Tris-acético 1 M pH 5. Se adicionó 1 µl de tRNA (5 µg/µl) y se precipitó con acetato de amonio y etanol. Se resuspendió la sonda en agua estéril y se utilizó para hibridar filtros réplica.

La pre-hibridación y la hibridación se realizaron en una solución conteniendo:

0,1 % PAES

6x SSPE

1 % SDS

0,01% NaPPi

Los filtros se incubaron con la solución de pre-hibridación por lo menos 1 hora y se hibridaron entre 4 y 12 horas.

Se efectuaron los siguientes lavados: 6x SSC, 0,1 % SDS; 2x SSC, 0,1% SDS; 0,2x SSC, 0,1 % SDS todos por 15 min.

Los filtros se expusieron a películas Kodak X-Omat en cassattes con pantallas intensificadoras.

9.1 Mini-Preparación de plásmidos

Se siguió el protocolo de Zhou et al. (1990) sin modificaciones excepto que se realizó una extracción con fenol/cloroformo después de la separación del DNA cromosómico y antes de la precipitación con etanol.

9.2 Preparación de plásmidos a gran escala

Tanto para la preparación de plásmidos como para la purificación por polietilenglicol se siguió el protocolo de Maniatis et al. (1990) sin modificaciones.

9.3 Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos obtenidos

Alrededor de 2 µg de DNA de los plásmidos de interés fueron incubados con las enzimas Hind III (20 unidades) y Xho I (20 unidades) con los respectivos buffers provistos por los proveedores de las enzimas (BRL, New England Biolabs) restricción comerciales en un volumen final de 20 µl.

9.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los plásmidos recombinantes obtenidos en la colección de cDNA diferencial sin digerir y digeridos con Hind III y Bam HI se corrieron en geles de agarosa de 0,6; 0,8 ó 1 % (p/v) en buffer TAE dependiendo del tamaño del plásmido. Se siguió el protocolo de Maniatis et al. (1982).

RESULTADOS

1. DETERMINACION DEL MOMENTO OPTIMO DE INOCULACION

Con el objeto de evaluar los efectos génicos de la reacción a Puccinia recondita tritici, evitando la mayor cantidad de efectos no asociados a dicha reacción, particularmente los derivados del desarrollo de la hoja y el efecto indirecto de la enfermedad en este proceso, se realizaron experimentos para determinar a cuántos días desde el momento de la siembra era aconsejable inocular.

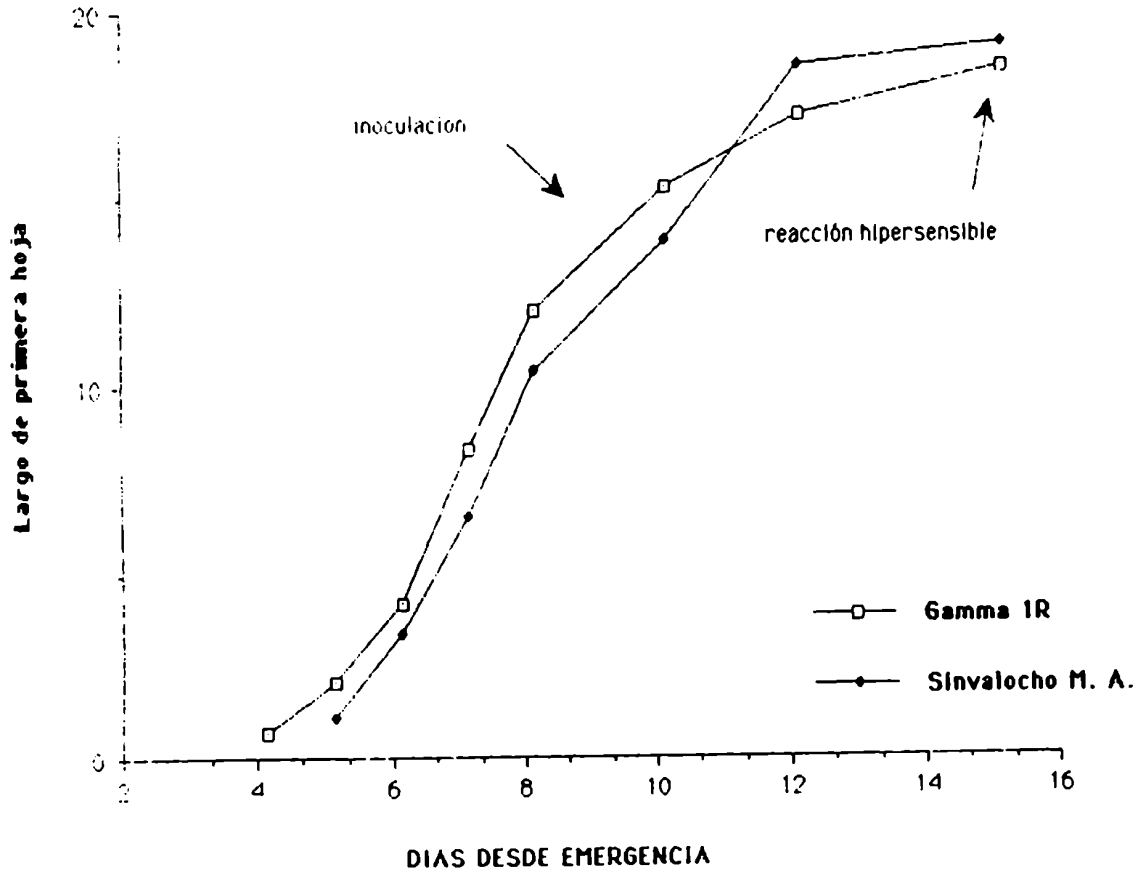
El gráfico 1 muestra la curva de elongación de primera hoja promedio desde el momento de emergencia hasta el día 15 de las dos líneas aquí estudiadas

Alrededor de los días 8 y 9 el crecimiento se hace más gradual, la primera hoja está totalmente expandida y la segunda hoja está apenas emergiendo. No hubo diferencias significativas en el crecimiento desde este momento hasta la aparición de síntomas entre plantas resistentes, plantas susceptibles y controles sin inocular. Se considera este periodo el más adecuado para la inoculación con el patógeno ya que las hojas son aún suficientemente jóvenes para que la infección sea efectiva y por lo mencionado anteriormente se evitan efectos colaterales de crecimiento que puedan estar asociados a la reacción a roya.

2. EVALUACION DEL GRADO DE REACCION Y SINTOMATOLOGIA.

La reacción hipersensible es evidente siete días después de la inoculación (Figura 3) siendo el número de manchas hipersensibles promedio de 24/hoja. En las plantas susceptibles los uredosoros del hongo aparecen hacia el décimo día después de la inoculación siendo el número de pústulas promedio de 67/ hoja (Figura 4), en las condiciones de crecimiento e inoculación utilizadas.

Gráfico 1: Curva de elongación de primera hoja en función del tiempo.



Con el objeto de determinar el momento óptimo de inoculación de las plántulas de trigo, para evitar la mayor cantidad de efectos génicos no asociados directamente a la reacción a P. recondita tritici se efectuaron mediciones de largo de primera hoja desde emergencia en adelante. Se graficó el promedio de largo de primera hoja (cm) obtenido a partir de 10 hojas, de cada día y de ambas líneas, en función de los días desde emergencia.

Figura 3: Reacción hipersensible.



Se inocularon plantas de Sinvalocho M.A. con el clon FO₁ originando una interacción incompatible, que es visible a los 7 días posteriores a la inoculación reveladas como aparición de pequeñas manchas cloróticas alrededor del sitio de penetración del hongo.



Pústulas del clon FO₁ desarrollando sobre el hospedante susceptible, Gamma 1R. Estas pústulas son visibles hacia el día 10 después de la inoculación.

3. PROTEINAS SINTETIZADAS DE NOVO

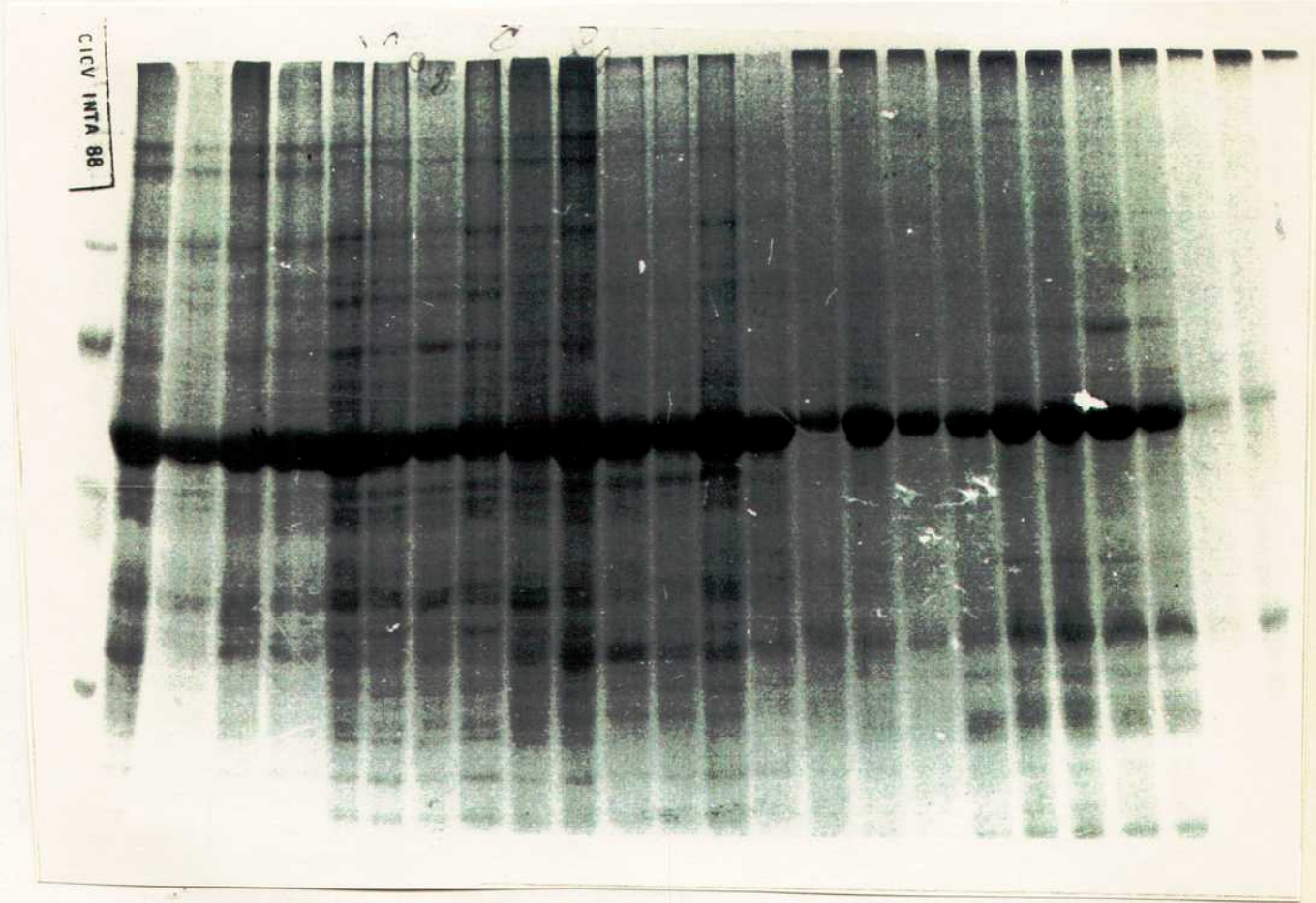
3.1 Comparación de sistemas de marcación de hojas "in vivo".

La optimización del sistema de marcación de proteínas sintetizadas "de novo" es importante pues los experimentos de tinción de geles con Azul brillante de Coomassie R no revelaron cambios polipeptídicos reproducibles entre plantas resistentes, susceptibles o controles sin inocular (Figura 5). Además mediante pulsos de marcación con aminoácidos radiactivos se está evaluando el momento en que comienza a inducirse la síntesis o la misma es detenida, y permite que su comportamiento pueda ser seguido en los días subsiguientes. Esto no es posible cuando se evalúan los patrones electroforéticos de proteínas "frías" pues en este caso si los cambios son cuantitativos, el método de tinción de proteínas totales no es muy sensible, por ser acumulativo sobre todo en presencia de un nivel basal alto del mismo polipéptido que puede enmascarar inducciones o inhibiciones en la velocidad de síntesis. El primer método ensayado de "marcado" de proteínas sintetizadas "in vivo" fue la absorción a través de raíz del aminoácido radiactivo. Debido a que los niveles de incorporación fueron muy bajos con un promedio de incorporación de 5%, se probó un segundo método de marcación, más directo, a través de la vaina. En este caso hubo buena incorporación (Tabla 2) con un promedio de incorporación entre 40-60% y por lo tanto se adoptó este método de marcación para todos los ensayos subsiguientes. Determinaciones previas hechas en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo, indican que la abscisión de las hojas no afecta el desarrollo de la reacción frente al patógeno (Hector Saione, comunicación personal).

3.2. Comparación de sistemas de electroforesis y procesamiento para fluorografía.

Hojas infectadas con roya fueron colocadas en tubos para permitir la incorporación de pulsos de metionina o leucina radiactiva a través de la vaina. Las proteínas marcadas se fraccionaron y corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes pero con distintos buffers de corrida. La comparación de los dos sistemas de electroforesis ensayados, demostró que la resolución de las bandas polipeptídicas fue mejor cuando se siguió el protocolo de Altman, descrito en la sección anterior. Asimismo cuando se compararon dos métodos de tratamiento del gel para fluorografía utilizando salicilato de sodio o PPO-DMSO, el sistema más eficaz en cuanto a intensidad de bandas fue el de PPO-DMSO.

Figura 5: Electroforesis de proteínas totales de hoja a distintos tiempos post-infección de las líneas Gamma 1R y Sinvalocho inoculadas con el clon FO₁ y controles sin inocular.



Las plantas fueron cultivadas e inoculadas en condiciones controladas según se indica en Materiales y Métodos. A diferentes tiempos posteriores a la infección se cortaron diez hojas de cada tratamiento, congelándose a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Las muestras de proteínas totales obtenidas se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes según método de Altman. El gel se coloreó con azul brillante de Coomassie R.

3.3. Caracterización de los patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas "in vivo".

3.3.1. Curva de tiempo del proceso de infección

Con el objeto de detectar en qué momento del proceso de infección se expresan los productos de los genes intervinientes en el reconocimiento específico de hospedante y patógeno, se tomaron hojas de una interacción incompatible (Sinvalocho M.A.-FO₁) y de una interacción compatible (Gamma 1R-FO₁) así como de los correspondientes controles y se incorporó metionina radiactiva mediante pulsos en las proteínas sintetizadas "de novo", por el método de absorción a través de vaina, como se describe en Materiales y Métodos.

Luego de los tratamientos, secado y exposición de los geles se obtuvieron autoradiografías que permitieron comparar los patrones electroforéticos de los polipéptidos a lo largo del proceso de infección. Durante los primeros dos días posteriores a la inoculación, no se detectaron cambios polipeptídicos evidentes tanto en interacciones compatibles como incompatibles respecto a los controles sin inocular (Figura 6 A). En la interacción compatible Gamma 1R-FO₁ hacia el segundo día, se induce una banda polipeptídica de 85 kDa pero su intensidad se hace máxima hacia el tercer día y se mantiene hasta la aparición de pústulas (día 10).

Por otra parte se detectaron polipéptidos que se expresan hacia el tercer día de infección y mantienen su intensidad durante los días siguientes, no solo en hojas infectadas sino también en controles inoculados con talco solamente (Bandas de 74 y 80 kDa). Estos polipéptidos que se inducen en forma inespecífica podrían estar involucrados en un mecanismo de respuesta generalizada como es el caso conocido como respuesta a la herida inducida por etileno.

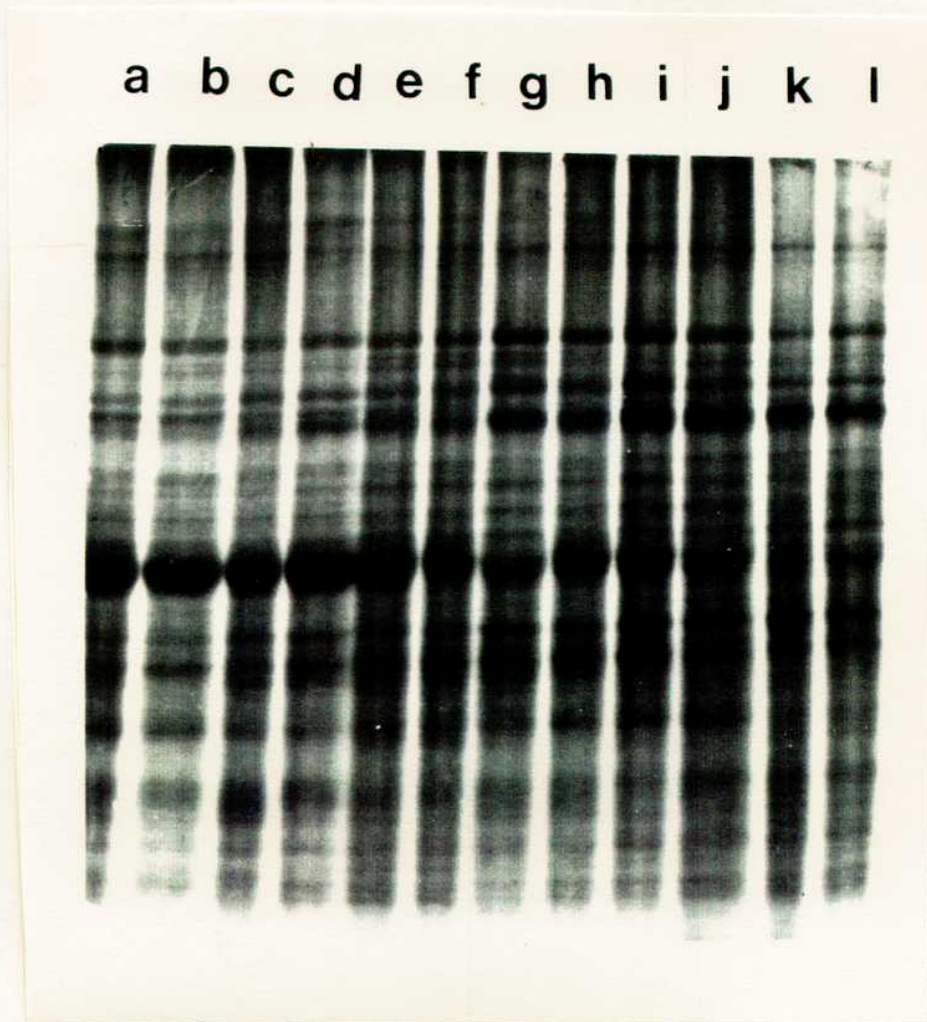
En la interacción incompatible Sinvalocho M.A.-FO₁, no se detectaron cambios muy conspicuos en el patrón electroforético de proteínas a lo largo del proceso de infección entre plantas infectadas y plantas control (Figura 6 B).

En la fracción particulada hay una banda que se induce en la interacción compatible Gamma 1R-F0₁ hacia el tercer día después de la inoculación, cuya especificidad se discute en la sección siguiente (Figura 7 B).

Figura 6: Patrones electroforéticos correspondientes a proteínas sintetizadas "de novo" durante el proceso de infección desde el primer día posterior a la inoculación.

A. Interacción compatible





Las plántulas fueron cultivadas en condiciones controladas para ser inoculadas y procesadas como se indicó en Materiales y Métodos. A diferentes tiempos posteriores a la infección se cortaron y se expusieron hojas a absorber ^{35}S -Metionina por los extremos cortados. Los homogenatos fueron ultracentrifugados y los sobrenadantes procesados para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Alrededor de 100.000 cpm de proteínas marcadas de la fracción soluble se sembraron en geles y luego se evidenciaron por autoradiografía.

A: Muestras de la línea Gamma 1R inoculadas con el clon FO₁ y plantas control.

a,b: primer día posterior a la inoculación; c,d: segundo día; e,f: tercer día; g,h: cuarto día; i,j: quinto día.

a,c,e,g,i: hojas inoculadas solamente con talco a diferentes tiempos de infección.

b,d,f,h,j: hojas inoculadas con la raza FO₁.

Las bandas de 80 y 74 kDa se inducen inespecíficamente en hojas infectadas y controles sin inocular. La banda de 85 kDa se induce específicamente en las hojas infectadas.

B: Muestras de Sinvalocho M.A. inoculadas con el clon FO₁ y controles sin inocular.

a,b: primer día posterior a la inoculación; c,d: segundo día; e,f: tercer día; g,h: cuarto día; i,j: quinto día; k,l: séptimo día.

a,c,e,g,i,k: hojas inoculadas solo con talco.

b,d,f,h,j,l: hojas inoculadas con la raza FO₁.

No se observan cambios muy conspicuos.

3.3.2. Análisis de la especificidad de bandas polipeptídicas

Debido a que los primeros cambios polipeptídicos de importancia relacionados con la infección se detectaron hacia el tercer día después de la inoculación, el estudio de la especificidad de dichos polipéptidos se centró en este momento. Se compararon todas las interacciones compatibles e incompatibles descritas en la tabla 1, así como los correspondientes controles.

3.3.2.1. Variación en la tasa de síntesis proteica en plantas infectadas

Para las distintas interacciones hospedante-patógeno se estimó la tasa de síntesis proteica midiendo la radiactividad incorporada en el material precipitable en presencia de TCA al 10% (Tabla 2A). Resulta interesante resaltar que se detectó un incremento en la síntesis proteica global en todas las plantas inoculadas, al compararlas con los respectivos controles sin infectar, excepto en el caso de las interacciones que involucran a la raza FO₂ cuya tasa de síntesis proteica no difieren significativamente del control a un nivel de significación del 5% (Prueba de Tukey).

Las diferencias en las tasas de incorporación entre interacciones compatibles e incompatibles (Tabla 2B) no fueron estadísticamente significativas por lo que se deduce que si bien el proceso de inoculación con esporas fúngicas activa globalmente la síntesis de proteínas, esta activación no depende del resultado de la interacción.

Tabla 2: Incorporación de ³⁵S-Metionina en polipéptidos sintetizados "de novo".

A. Valores absolutos de radiactividad incorporada en relación a radiactividad suministrada

Interacción	c.p.m insolubles en TCA/ µl de extracto		c.p.m. totales suministradas/µl	
	Exper. 1	Exper. 2	Exper. 1	Exper. 2
Sinvalochu M.A. (inoculada con talco)	28.492	28.350	70.192	58.440
Sinvalochu M.A.-FO ₁	44.624	32.084	67.000	43.240
Sinvalochu M.A.-FO ₂	32.237	22.025	58.320	38.305
Sinvalochu M.A.-FO ₃	12.919	36.073	22.046	53.283
Gamma IR (inoculada con talco)	6.470	12.985	15.386	24.116
Gamma IR-FO ₁	30.923	38.256	54.065	51.420
Gamma IR-FO ₂	27.037	33.296	54.760	48.536
Gamma IR-FO ₃	17.259	20.264	22.502	23.346

B. Porcentaje de incorporación de ³⁵S-Metionina en polipéptidos sintetizados "de novo":

Interacción	porcentaje de incorporación				valor medio
	(cpm insolubles en TCA/ cpm totales) x 100		valores transformados		
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
Sinvalocho M.A. (inoculada con talco)	40.6	48.1	39.6	43.9	41.7
Sinvalocho M.A. - FU ₁ [-]	66.5	74.2	54.6	59.5	57.0*
Sinvalocho M.A. - FU ₂ [-]	55.3	57.5	48.0	49.3	48.7
Sinvalocho M.A. - FU ₃ [+]	58.6	67.7	49.9	55.4	52.7*
Gamma IR (inoculada con talco)	42.0	52.7	40.1	46.7	43.5
Gamma IR - FO ₁ [+]	57.2	74.4	49.1	59.6	54.4*
Gamma IR - FO ₂ [-]	49.4	68.6	44.6	55.9	50.3
Gamma IR - FU ₁ [-]	76.7	86.8	61.1	68.7	64.9*

Se inocularon plántulas de ocho días con esporas, cortándose al tercer día las láminas foliares para suministrar un pulso radiactivo a través de su base. Se homogeneizaron hojas de los distintos tratamientos y se midió la radiactividad asociada al material insoluble en TCA en un contador de centelleo líquido. La tabla muestra los porcentajes de incorporación obtenidos en dos experimentos independientes.

*: Los valores de porcentajes de incorporación se transformaron para poder compararlos por análisis de varianza

†: Promedio de los valores transformados.

‡: Interacciones que difieren de las hojas inoculadas con talco a un nivel de 5% de significación.

3.3.2.2. Patrones electroforéticos de interacciones hospedante-patógeno compatibles e incompatibles al tercer día del proceso de infección.

A fin de observar si este incremento generalizado de la síntesis proteica se refleja en la aparición de bandas específicas se analizaron los patrones de bandas por electroforesis. Se detectaron cambios polipeptídicos reproducibles en seis bandas polipeptídicas, 5 correspondientes a la fracción soluble y una correspondiente a la fracción particulada. Las bandas diferenciales fueron cuantificadas con un densitómetro y los valores de absorbancia graficados para cada una de las interacciones en estudio (Gráficos 2 y 3).

La tabla 3 resume la cuantificación de las diferencias en intensidad de las bandas polipeptídicas en estudio en las distintas interacciones hospedante-patógeno. En todos los casos, para determinar aumento o disminución en intensidad de bandas polipeptídicas se compararon calles que presentaban la misma intensidad de una banda independiente del proceso de infección, tomada como referencia. Para ello se midieron varias autorradiografías de diferentes geles y distintos tiempos de exposición.

a) Incrementos en intensidad de bandas polipeptídicas diferenciales.

* Bandas asociadas con interacciones incompatibles ("resistencia").

Banda de 39 kDa. Se detectó incremento en radiactividad asociada a una banda polipeptídica de 39 kDa en interacciones incompatibles (Gamma 1R-F0₃ y Sinvalocho M.A.-F0₁) en comparación con interacciones compatibles o controles sin infectar (Figura 7A, calles b y c). Esta fue la única banda que se pudo detectar asociada con una reacción de resistencia.

* Bandas asociadas con interacciones compatibles
(enfermedad)

Banda de 15 kDa. Una banda de 15 kDa correspondiente a la fracción particulada es específica de la interacción Gamma 1R-F0₁ (Figura 7B, calle i). Esta banda está ausente en Gamma 1R control y en cualquier otra interacción compatible o incompatible.

Tabla 3:

Resumen esquemático de los cambios polipeptídicos detectados en diferentes interacciones hospedante-parásito al tercer día del proceso de infección.

Interacción	Radiactividad relativa asociada con bandas polipeptídicas (unidades arbitrarias)							
	fracción particulada		Fracción soluble (KD)					
	15	85	52	39	37	28		
Sinvaloch M.A. (inoculada con talco)	0	0,25	0	0,37	1	1		
Sinvaloch M.A. - FU ₁ [-]	0	1	0	1	0,24	0,54		
Sinvaloch M.A. - FU ₂ [-]	0	0,20	0	1	0,57	0,80		
Sinvaloch M.A. - FU ₃ [+]	0	0,70	0	0,43	0,57	0,37		
Gamma IR (inoculada con talco)	0	0,5	0,5	0,25	0,94	0,94		
Gamma IR - FO ₁ [+]	1	1	0	0,12	0,84	0,56		
Gamma IR FU ₁ [-]	0	0	0	0,63	0,63	0,42		
Gamma IR FU ₂ [-]	0	0	1	0,63	0,63	0,93		

Las bandas polipeptídicas diferenciales están identificadas por sus pesos moleculares en la parte superior de la tabla.

Los números corresponden a un índice arbitrario de radiactividad asociada a cada banda. Este índice fue estimado después de medir densitométricamente varias autoradiografías (diferentes tiempos de exposición y diferentes geles). El índice fue calculado como: lectura densitométrica para una banda determinada / lectura densitométrica para la banda de la misma movilidad que muestra el máximo de incorporación. Los cambios en la velocidad de síntesis relativa de polipeptidos detectados incluyen no solo aumentos sino también casos de disminución en incorporación de isótopos a bandas particulares.

Banda de 85 kDa. En la misma combinación hospedante-patógeno, Gamma 1R-F0₁, una banda de 85 kDa correspondiente a la fracción soluble, mencionada en los ensayos de curva de tiempo, presenta un incremento en intensidad sólo en esta interacción, no así en las demás combinaciones que involucran a la mutante Gamma 1R (Figura 7A, calles a,c,e). En Sinvalocho M.A. una banda de similar movilidad, está presente en todas las interacciones que involucran a Sinvalocho M.A. (Figura 7A, calles b y d) y en plantas inoculadas solo con talco (Figura 7A, calle f) El Gráfico 1 muestra la cuantificación de la radiactividad asociada a esta banda medida en densitómetro.

Tanto las bandas de 15 kDa como la de 85 kDa podrían estar asociadas a la acción de los genes A₁/A₂ ya que están presentes en Gamma 1R y no en Sinvalocho. En este caso A₁/A₂ confieren compatibilidad cuando Gamma 1R es enfrentada con el clon F0₁.

* Bandas no asociadas específicamente con compatibilidad o incompatibilidad.

Banda de 22 kDa. Una banda de 22 kDa se induce inespecíficamente en Sinvalocho M.A. inoculadas con razas compatibles o incompatibles (Figura 8).

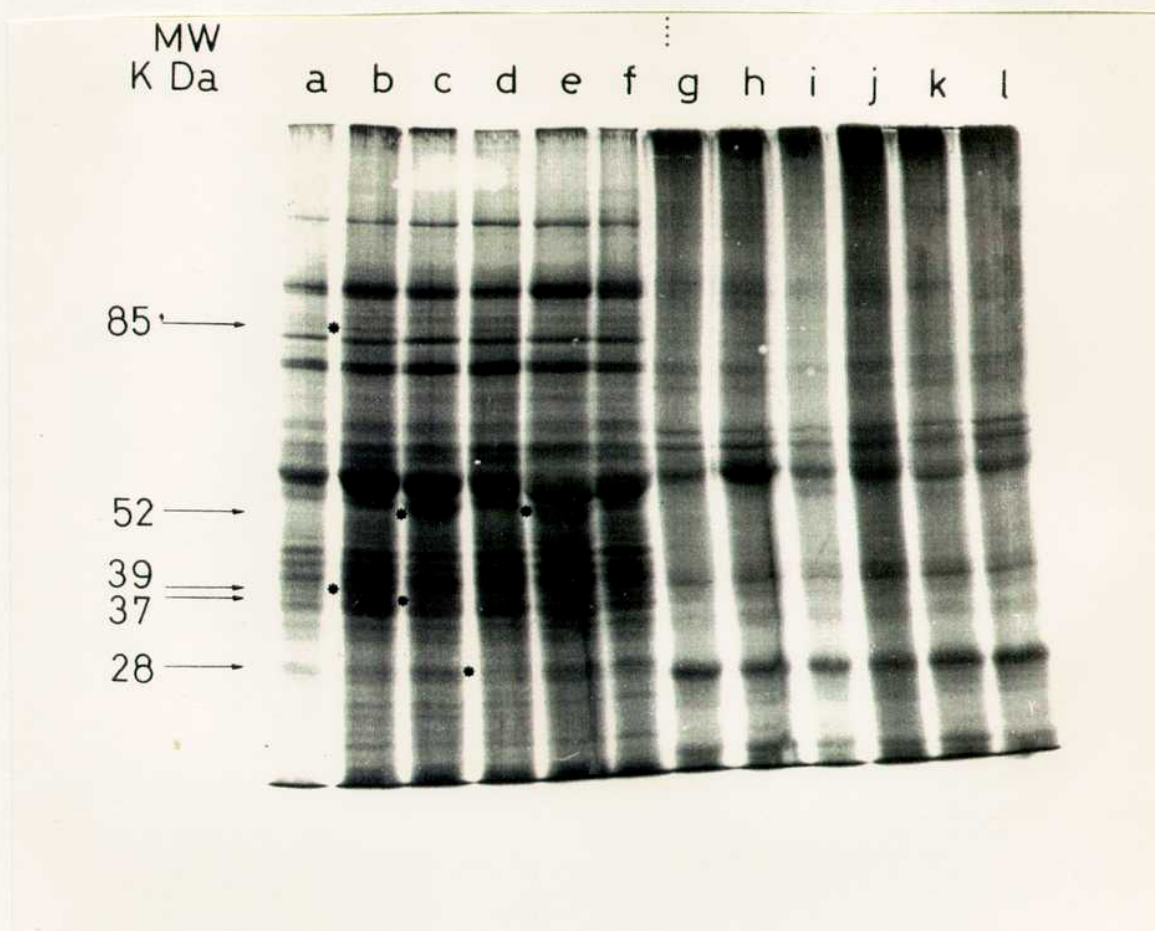
b. Disminución en intensidad de bandas polipeptídicas diferenciales

* Bandas asociadas con incompatibilidad

Algunas de las bandas proteicas normalmente presentes en plantas no infectadas muestran una disminución específica en su intensidad de marcación en algunas interacciones.

Figura 7: Patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas "de novo" al tercer día del proceso de infección.

A.



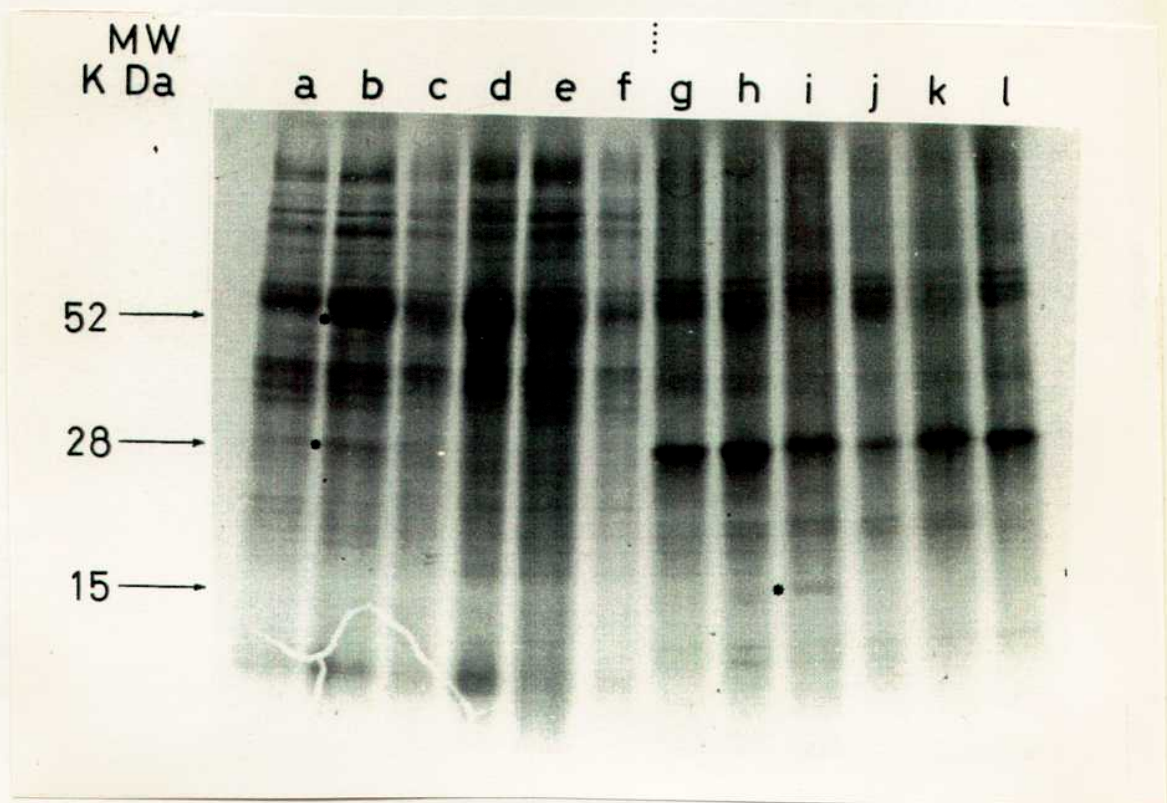
Se cultivaron plántulas de trigo para ser inoculadas y procesadas como se describe en Materiales y Métodos. Alrededor de 30.000 cpm de proteínas de las fracciones solubles y particuladas se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y se visualizaron por fluorografía representativa de varios ensayos. Las flechas indican las bandas que mostraron diferencias reproducibles en radiactividad en interacciones hospedante-patógeno específicas después del análisis de resultados de varios experimentos independientes.

A: SDS-PAGE en gel 10%. a-f: fracción soluble; g-l: fracción particulada; a,g: Gamma 1R-FO₁; b,h: Sinvalocho M.A.-FO₁; c,i: Gamma 1R-FO₃; d,j: Sinvalocho M.A.-FO₃; e,k: hojas de Gamma 1R inoculadas con talco; f,l: hojas de Sinvalocho M.A. inoculadas con talco.

B: SDS-PAGE en gel en gradiente 10-20%. a-f: fracción soluble; g-h: fracción particulada. a,g: Gamma 1R-FO₂; b,h: Sinvalocho M.A.-FO₂; c,i: Gamma 1R-FO₁; d,j: Sinvalocho M.A.-FO₁; e,k: Hojas de Gamma 1R inoculadas con talco; f,l: hojas de Sinvalocho M.A. inoculadas con talco.

Figura 7

B.



Banda de 37 kDa. Una banda de 37 kDa está presente con intensidad similar en todos los sistemas ensayados, excepto en la interacción incompatible Sinvalocho M.A.-FO₁ (Figura 2A, calle b). El comportamiento de esta banda está asociado con el gen A₀ que confiere incompatibilidad al clon FO₁.

* Bandas asociadas con compatibilidad

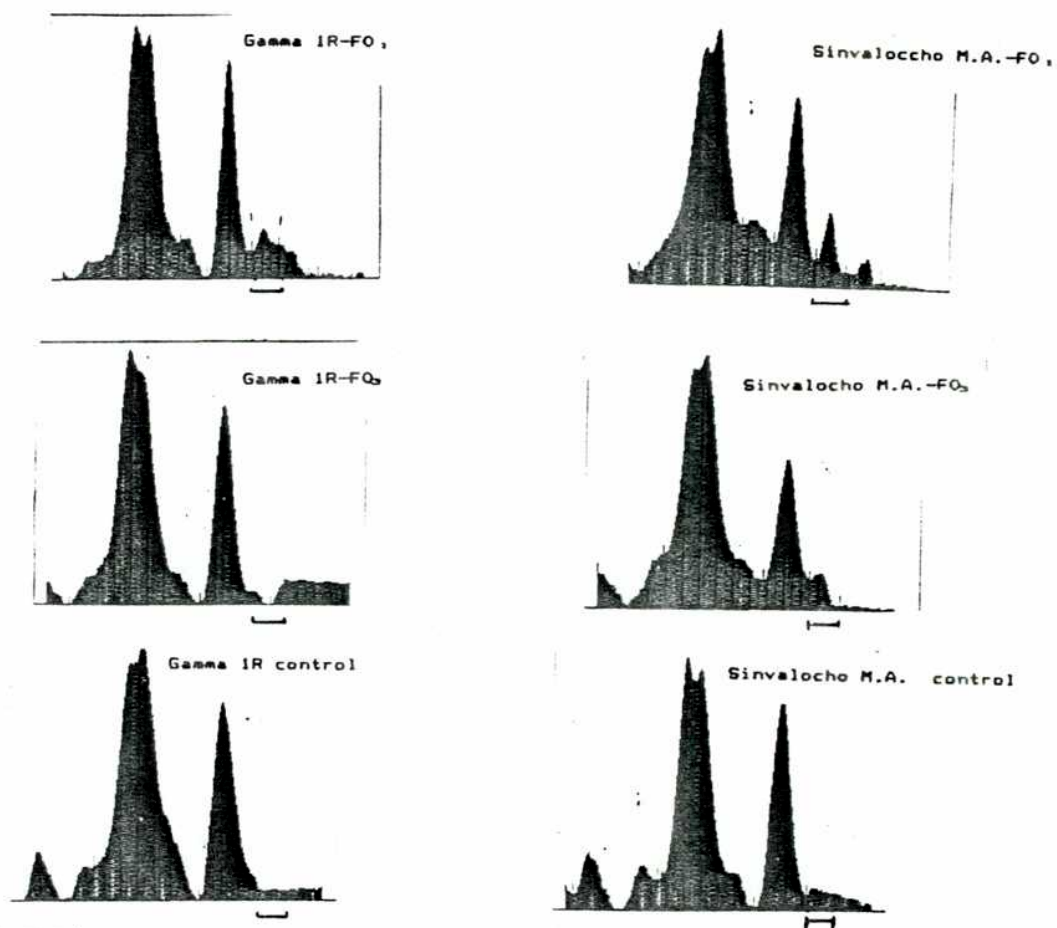
Banda de 52 kDa. La incorporación de ³⁵S-Metionona a una banda de 52 kDa se suprime en Gamma 1R-FO₁. comportamiento que estaría asociado a la acción de los genes A₁/A₂.

Banda de 28 kDa. Una banda de 28 kDa posiblemente en asociación con el gen A₀ ya que si bien está presente en todas las combinaciones que involucran a Gamma 1R con cualquier raza virulenta o avirulenta y aún Gamma 1R control, disminuye de intensidad en la interacción Sinvalocho M.A.-FO₂.

* Bandas no asociadas específicamente con compatibilidad o incompatibilidad.

Banda de 23 kDa. Otra banda de 23 kDa está presente en Sinvalocho M.A. control y en Sinvalocho-FO₁ pero su intensidad disminuye en las interacciones Sinvalocho-FO₂ y Sinvalocho-FO₃ (Figura 8).

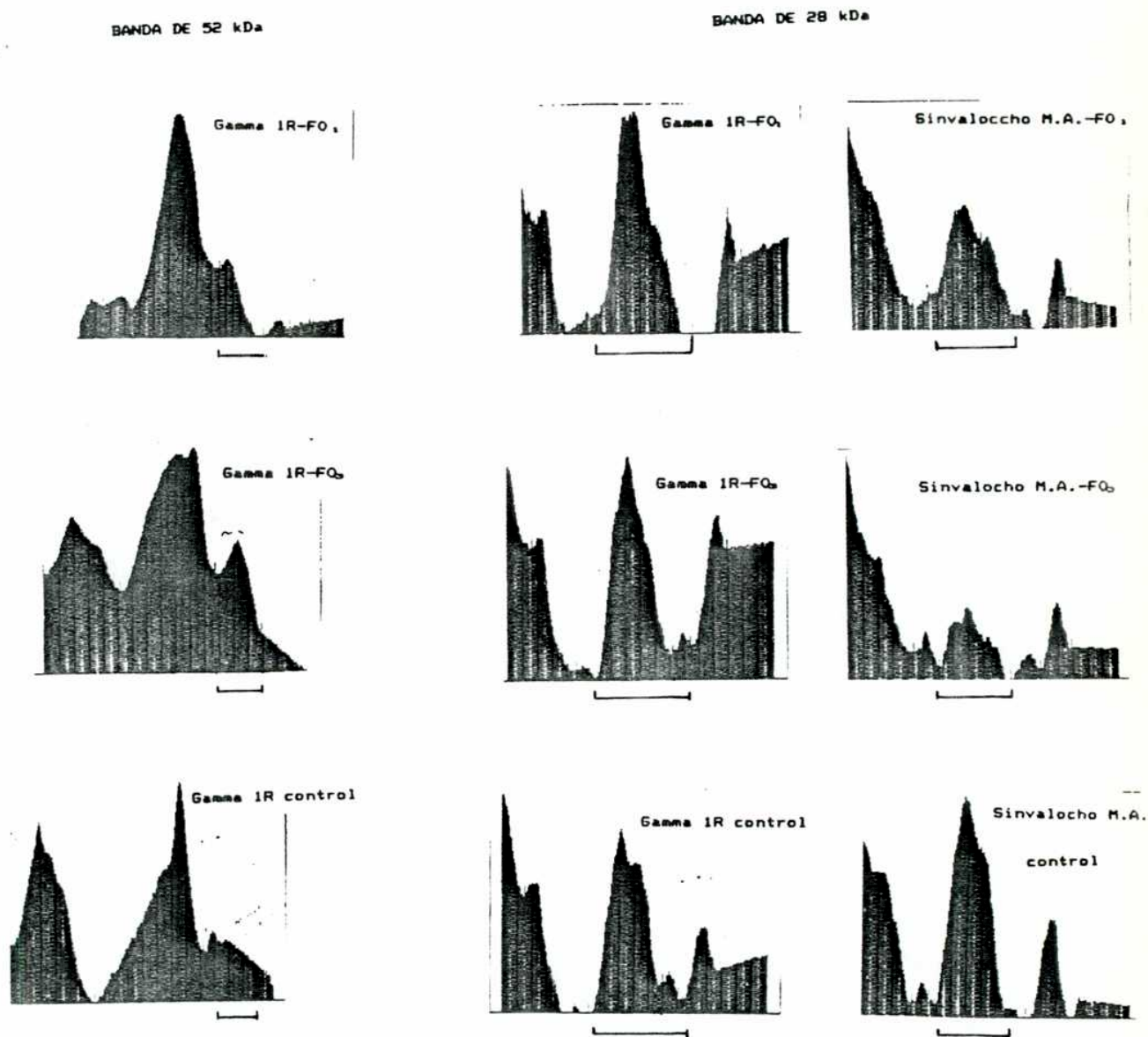
Gráfico 2: Cuantificación de la radiactividad asociada a la banda polipeptídica de 85 kDa.



Lectura de la banda polipeptídica de 85 kDa de un autoradiograma típico, correspondiente a la figura 7A, con un densitómetro (Corning 780). Los valores correspondientes a la Absorbancia de cada banda se obtienen teniendo en cuenta intensidad y ancho de banda. En Gamma 1R hay un pico correspondiente a la banda de 85 kDa que no está presente en Gamma1R-FO₃ ni en Gamma 1R control. En Sinvaloccho M.A. una banda con movilidad similar está presente en todas las interacciones incluido el control.

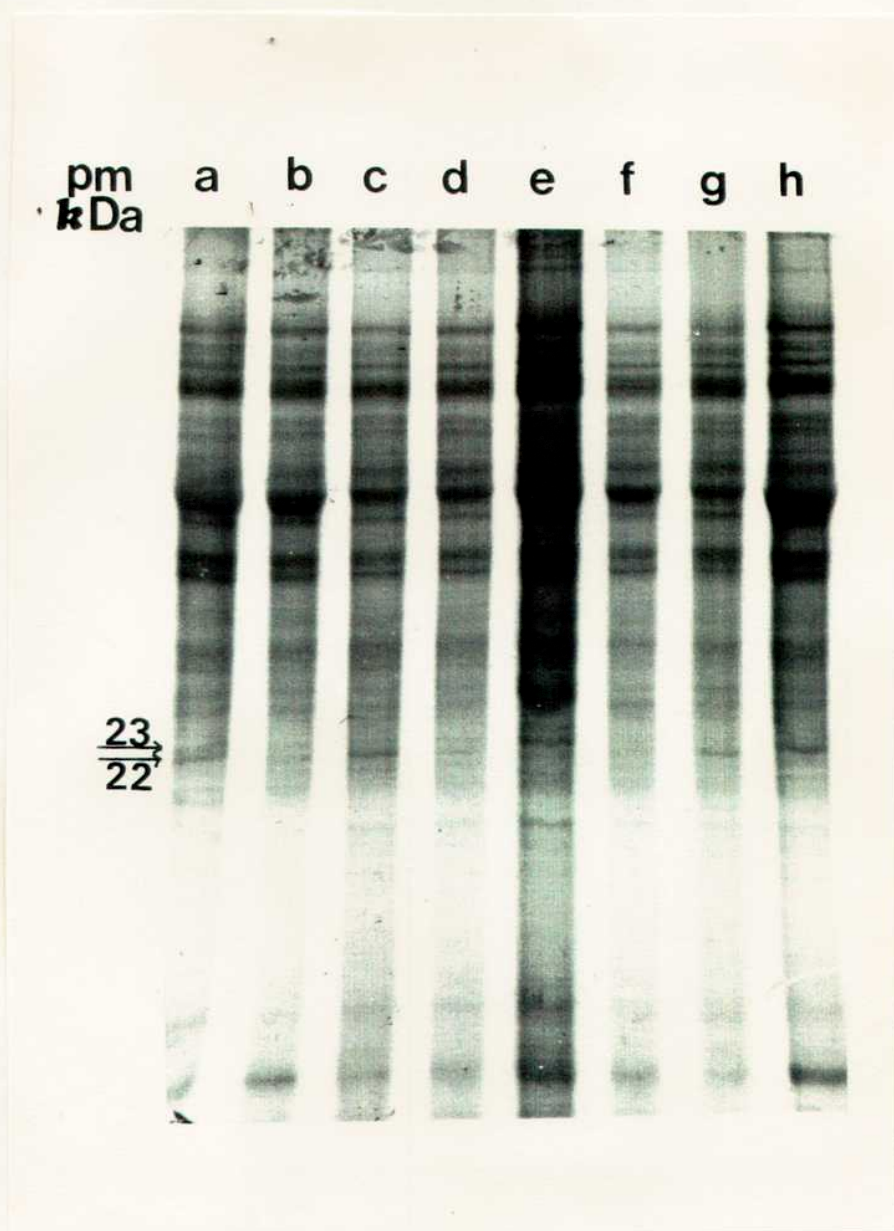
Gráfico 3: Cuantificación de la radiactividad asociada a las bandas polipeptídicas de 52 y 28 kDa.

FOYMA



La lectura corresponde a un autoradiograma típico como el de la Figura 7A. El pico de absorción correspondiente a la banda de 52 kDa no aparece en Gamma 1R-FO₁ a diferencia de lo que ocurre en Gamma 1R-FO₃ y Gamma 1R testigo. La banda de 28 kDa presenta un pico de absorción menor en Sinvaloccho M.A.-FO₃ comparado con las demás interacciones.

Figura 8: Electroforesis de proteínas sintetizadas "de novo", marcadas con ^{35}S -Metionina y corridas en un gel desnaturante de poliacrilamida al 10% durante 4 hs en las mismas condiciones descriptas anteriormente.



Se sembraron 30.000 cpm en cada calle.
 a: Sinvalocho M.A.-FO₁; b: Gamma 1R-FO₁; c: Sinvalocho M.A.-FO₂; d: Gamma 1R-FO₂; e: Sinvalocho M.A. Testigo; f: Gamma 1R Testigo; g: Sinvalocho M.A.-FO₃; h: Gamma 1R-FO₃.

4. CARACTERIZACION DE LOS PATRONES ELECTROFORETICOS DE PROTEINAS SINTETIZADAS "IN VITRO"

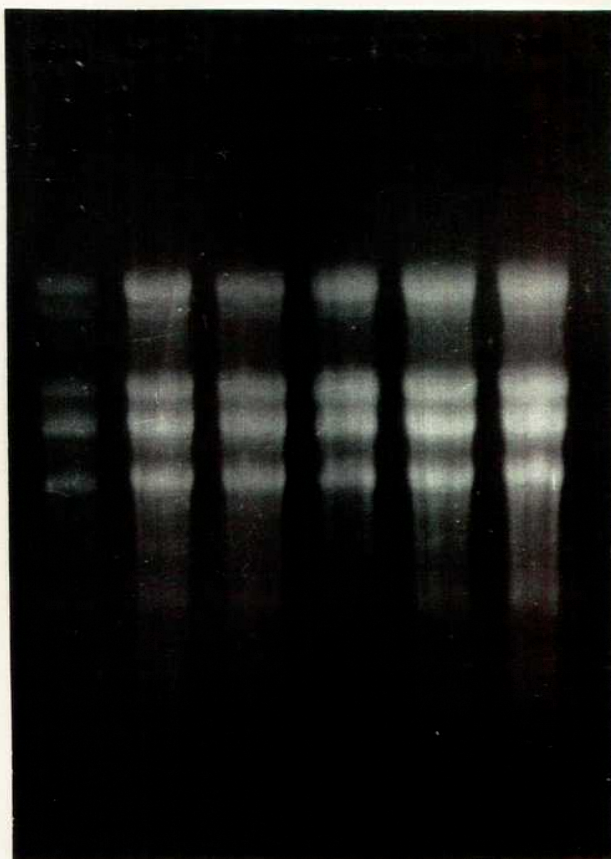
Una vez determinada la asociación de polipéptidos específicos con ciertas relaciones hospedante-patógeno, fue de interés para el presente trabajo determinar a qué nivel está dada la regulación de los cambios arriba mencionados, es decir si son debidos a síntesis o degradación de mRNAs específicos, modificaciones de proteínas preexistentes, etc. Para ello se encaró la detección de los RNA mensajeros correspondientes mediante análisis por SDS-PAGE de las proteínas sintetizadas "in vitro", en un sistema libre de células consistente en un lisado de reticulocitos de conejo.

4.1. Curva de tiempo de proteínas sintetizadas "in vitro" en interacciones compatibles e incompatibles.

A partir de hojas de Sinvalocho M.A. y Gamma 1R inoculadas con la raza FO₁ y de los respectivos controles inoculados solo con talco se procedió a la purificación de RNA desde el primer día posterior a la inoculación hasta el séptimo día mediante extracción en un medio con detergente, partición con solventes orgánicos y precipitación diferencial con LiCl. El rendimiento promedio de RNA obtenido con la metodología descrita en Materiales y Métodos fue de 400 µg RNA/gr de tejido fresco. Se chequeó el estado del mismo a través de electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El resultado se muestra en la figura 9.

Se observan varias bandas debido a que el RNA total incluye rRNA de cloroplastos y mitocondrias además del citoplasmático (rRNA's de cloroplastos: 23S, 16S; 5S y 4,5S; rRNA's de mitocondrias: 26S; 18S y 5S rRNA's citoplasmáticos: 18S y 28S). La buena definición de estas bandas nos indica la integridad (calidad) del RNA obtenido libre de degradación.

Figura 9: Gel de agarosa para RNA. Chequeo del RNA a utilizar en las traducciones "in vitro".



Gel de agarosa al 1,5% con formaldehído (desnaturalizante). El RNA se incubó a 60 °C 5 min. en presencia de 50% formamida y 6% formaldehído para desarmar estructuras secundarias. Se sembraron 10 µg RNA en cada calle. La corrida se realizó durante 5 hs a 5 Volts/cm.
Calles: a) Gamma 1R-FO₂; b) Sinvalocho M.A.-Testigo; c) Gamma 1R-Testigo; d) Gamma 1R-FO₁; e) Sinvalocho M.A.-FO₁; f) Sinvalocho M.A.-FO₂.

La Figura 10 A, muestra una curva de tiempo de las proteínas sintetizadas "in vitro" reflejo de los RNAs mensajeros de la interacción Gamma 1R-FO₁ del segundo al séptimo día de infección. Los patrones electroforéticos de polipéptidos marcados con ³⁵S-Metionina obtenidos de plantas inoculadas con el clon FO₁ y de plantas control muestra que los primeros cambios polipeptídicos detectables (Bandas de 20,5 y 24 kDa) ocurren hacia el tercer día después de la infección, en correspondencia con los cambios detectados en los experimentos de marcación "in vivo".

Un RNA mensajero con actividad codificante para un polipéptido de 20.5 kDa se induce espontaneamente hacia el tercer día (Figura 10A, calle d) posterior a la inoculación pero su actividad incrementa significativamente en estadios tardíos del proceso de infección (Figura 10 A, calles f, h y j). Un comportamiento similar ocurre con el mRNA que codifica para un polipéptido de 32.5 kDa que se induce levemente en la interacción Gamma 1R-FO₁ hacia el tercer día (ver Figura 11, calle f) aumentando su intensidad en los días subsiguientes (Figura 10 A, calles h y j). Una banda de 24 kDa se induce también hacia el tercer día para alcanzar un máximo al cuarto día y luego disminuir en días posteriores. Por otra parte, hay una banda polipeptídica de 34 kDa presente tanto en plantas control como en plantas inoculadas, con un comportamiento opuesto ya que su intensidad decrece en plantas inoculadas en correlación con el proceso de infección (Figura 10 A, comparar día 5 (calle g) y día 7 (calle i)).

En la interacción incompatible Sinvalocho M.A.-FO₁, no se detectaron cambios polipeptídicos conspicuos durante el proceso de infección (Figura 10 B). Se detectó una inducción leve de una banda de 20.5 kDa en plantas inoculadas, con una movilidad similar a la mencionada en la interacción Gamma 1R-FO₁ siendo su intensidad mayor hacia el día 5 del proceso de infección (Figura 10 B, calle h). Una banda de 32,5 kDa se insinúa en las plantas inoculadas a partir del tercer día (Figura 10 B) confirmándose su presencia en el experimento del punto 5.2. (Figura 11, calle b).

Figura 10: Electroforesis de proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de RNA mensajeros de plántulas inoculadas con el clon FO₁ a distintos tiempos posteriores a la infección y de plantas control, inoculadas sólo con talco.

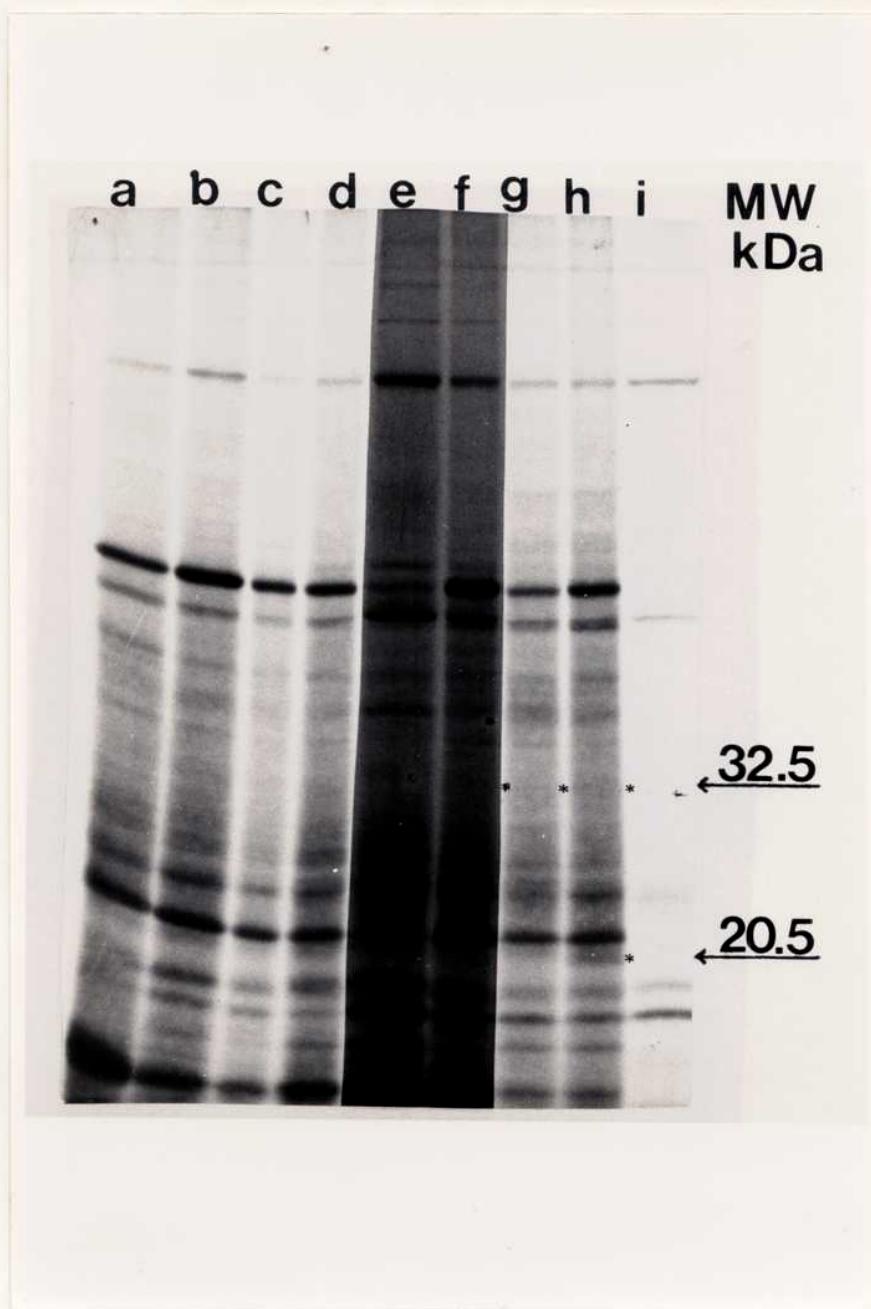
A.



A. a,c,e,g,i: Gamma 1R inoculadas sólo con talco. b,d,f,h, y j Gamma 1R inoculadas con roya; a,b: día 2; c,d: día 3; e,f: día 4; g,h: día 5; i,j: día 7; k: control endógeno.
 B. a,c,e: Sinvalocho M.A. inoculadas solo con talco; b,d,f,g,h: Sinvalocho inoculadas con roya. i: control endógeno (sin adición de RNA); a,b: día 1; c,d: día 2; e,f: día 3; g: día 4; h: día 5.

Figura 10

B.



4.2. Patrones de traducción de RNAs de diferentes interacciones compatibles e incompatibles

Con el objeto de evaluar la expresión de genes activos en interacciones específicas y distinguirlos de aquellas respuestas de tipo general, se inoculó con tres razas del patógeno a las dos líneas isogénicas de trigo. Se evaluó la acumulación diferencial de RNAs mensajeros en las seis interacciones hospedante-patógeno descritas en la Tabla 1 y en plantas inoculadas solamente con talco.

Debido a que los primeros cambios en polipéptidos sintetizados "in vitro" se detectaron hacia el tercer día del proceso de infección, tanto en interacciones compatibles como incompatibles, el análisis comparativo de los patrones electroforéticos correspondientes a todas las interacciones en estudio se efectuó en este periodo de tiempo. La figura 11, muestra el resultado de la electroforesis de patrones polipeptídicos de las proteínas sintetizadas "in vitro". La comparación de los patrones electroforéticos permite determinar cuáles de los cambios polipeptídicos detectados durante el proceso de infección (34: 32,5; 24 y 20,5 kDa) son específicos de la interacción Gamma 1R-FO₁ y cuáles ocurren también en otras interacciones compatibles e incompatibles, indicando entonces que serían cambios probablemente inespecíficos. La tabla 3 resume los cambios detectados en los polipéptidos sintetizados "in vitro" al tercer día del proceso de infección.

*Bandas polipeptídicas específicas

Se encontraron dos bandas cuya intensidad aumenta en dos interacciones específicas. Una banda de 24 kDa en la interacción compatible Gamma 1R-FO₁ (Figura 11) y una banda de 21,5 kDa en la interacción incompatible Sinvalochó M.A.-FO₂. Esta última banda está presente en todas las interacciones en estudio que involucran a Gamma 1R incluyendo plantas inoculadas solamente con talco pero su intensidad es muy débil en todas las interacciones de Sinvalochó M.A. incluyendo los controles, con la excepción de la mencionada interacción.

*Bandas asociadas con determinadas razas del patógeno

Los patrones electroforéticos de las figuras 5 y 6 indicaban que una banda de 32,5 kDa se inducía en las interacciones que involucraban a la raza FO₁, independientemente del tipo de infección (compatible o incompatible). La Figura 11 confirma este comportamiento y claramente muestra que esta banda es específica de dichas interacciones estando ausente en hojas control y en otras interacciones analizadas.

La banda de 20,5 kDa a pesar de estar presente en todas las interacciones incluyendo plantas inoculadas solo con talco, es más conspicua en aquellas relaciones hospedante-patógeno que involucran al clon FO₁.

La figura 12 confirma la inducción de las bandas de 32,5 kDa y 20,5 kDa en el sistema Sinvalocho-FO₁ y se detecta también un aumento en intensidad en una banda de 23,5 kDa en este sistema (calle c) comparado con el control (calle d) y con el sistema Sinvalocho M.A.-FO₃ (calles a y b).

*Bandas asociadas con más de una interacción
hospedante-patógeno

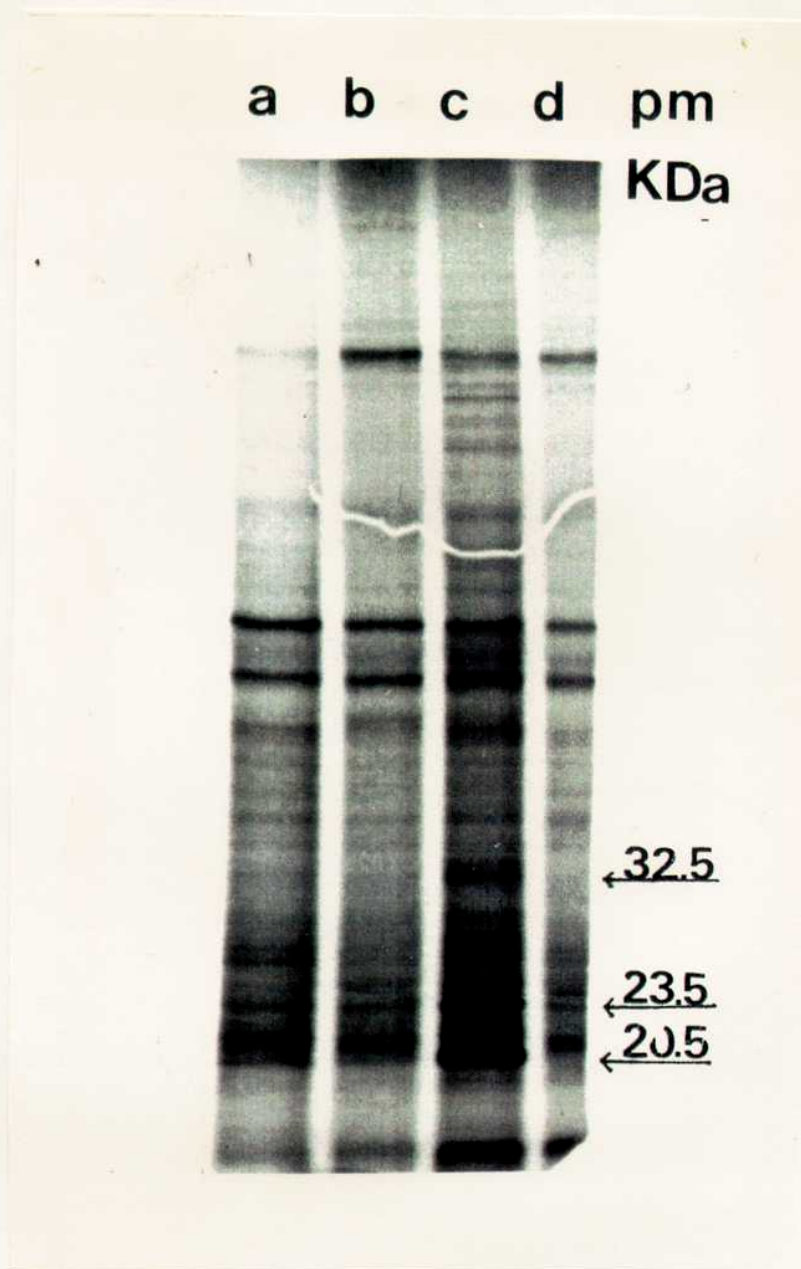
Los RNA mensajeros que codifican las bandas polipeptídicas de 14,5 y 13,5 kDa muestran un incremento en la traducción en las interacciones incompatibles Gamma 1R-FO₃ y Gamma 1R-FO₂. El comportamiento de estas bandas en Sinvalocho M.A. es diferente comparado con el de Gamma 1R. La banda de 13,5 kDa es independiente de la infección mientras que la banda de 14,5 kDa decrece en intensidad en Sinvalocho M.A.-FO₂ y Sinvalocho M.A. FO₃.

Figura 11: Patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de RNA de distintas interacciones hospedante-patógeno compatibles e incompatibles al tercer día del proceso de infección.



a: Sinvalocho M.A. control. b: Sinvalocho M.A.-FO₁; c: Sinvalocho M.A.-FO₃; d: Sinvalocho-FO₂; e: Gamma 1R-control; f: Gamma 1R-FO₁; Gamma 1R-FO₃; Gamma 1R-FO₂.

Figura 12: Patrón electroforético de proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de RNA mensajero de plántulas de Sinvalocho inoculadas con los clones FO₁ y FO₃ y controles sin inocular, al tercer día del proceso de infección.



a y b: Sinvalocho M.A.-FO₃ (dos traducciones "in vitro" distintas a partir de mRNAs de dos extracciones también distintas). c: Sinvalocho control; d: Sinvalocho M.A.-FO₁. Los patrones c y d son iguales por lo que se asegura la reproducibilidad de los patrones electroforéticos.

5. PROTEINAS RELACIONADAS CON LA PATOGENESIS

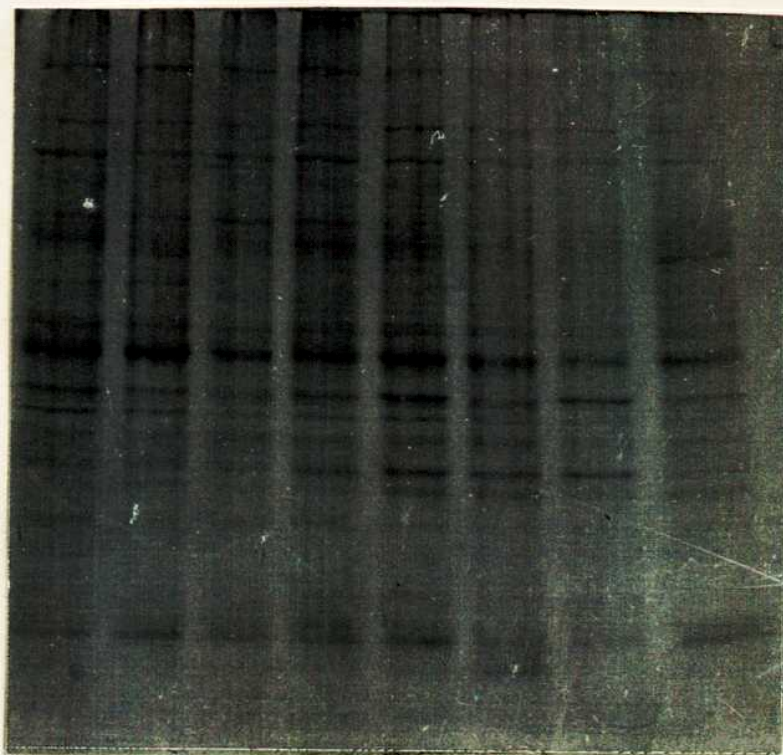
Si bien la mayoría de las diferencias detectadas tanto "in vivo" como "in vitro", son cambios tempranos y por lo tanto es poco probable que se trate de proteínas relacionadas con la patogénesis (Proteínas PR), se verificó esta posibilidad. Se realizó una extracción de proteínas ácidas a dos tiempos a lo largo del proceso de infección en interacciones compatibles e incompatibles.

El primer punto se tomó al cuarto día, período en que los cambios específicos ya eran detectables tanto en experimentos de marcación "in vivo" como en ensayos de traducción "in vitro". El segundo punto se tomó al séptimo día, en un estadio avanzado, cuando la reacción hipersensible ya es notoria y la aparición de pústulas es inminente.

La figura 13 muestra los patrones electroforéticos de las proteínas obtenidas en la fracción ácida, de las líneas isogénicas inoculadas con el clon FO₁ y los respectivos controles. A pesar que los cambios a nivel proteico y a nivel de mRNA son detectables en estas interacciones a los tres días de efectuada la inoculación, los patrones de proteínas ácidas presentan diferencias recién hacia el séptimo día. En ese momento una banda polipeptídica de alrededor de 10 KDa es evidente en la interacción compatible Gamma 1R-FO₁ pero no en la interacción incompatible Sinvalocho-FO₁.

Figura 13: Patrón electroforético de proteínas extraídas en medio ácido.

a b c d e f g h



← 10 kDa

Al cuarto y séptimo días posteriores a la infección se cortaron 10 hojas de Gamma 1R y Sinvalocho M.A. inoculadas con el clon FO₁ y de los respectivos controles sin infectar y se realizó una extracción en medio ácido, según se describió en materiales y métodos. Las proteínas se corrieron en SDS-PAGE y el gel fue coloreado con Azul brillante de Coomassie R.

a-d: Cuarto día; e-h: séptimo día; a y e: Gamma 1R-Testigo; b y f: Gamma 1R-FO₁; c y g: Sinvalocho testigo; d y h: Sinvalocho-FO₁.

6. ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN GENICA DE SEGMENTOS ISOGENICOS.

Como se mencionara anteriormente, la organización de genes de reacción a *P. recondita* en segmentos isofénicos alternando con genes caracterizados de gliadinas y/o glutelinas, hace interesante estudiar tanto a nivel proteico como a nivel de DNA, las posibles variaciones entre Sinvalocho M.A. y su mutante Gamma 1R de estos genes ligados que pueden servir de marcadores de las diferencias en los genes de reacción.

Como consecuencia del ligamiento entre estas dos familias de genes, es esperable encontrar patrones electroforéticos distintos tanto a nivel de proteínas como a nivel de DNA debidos a rearrreglos cromosómicos como consecuencia de la mutagénesis inducida.

6.1 Análisis de gliadinas y glutelinas.

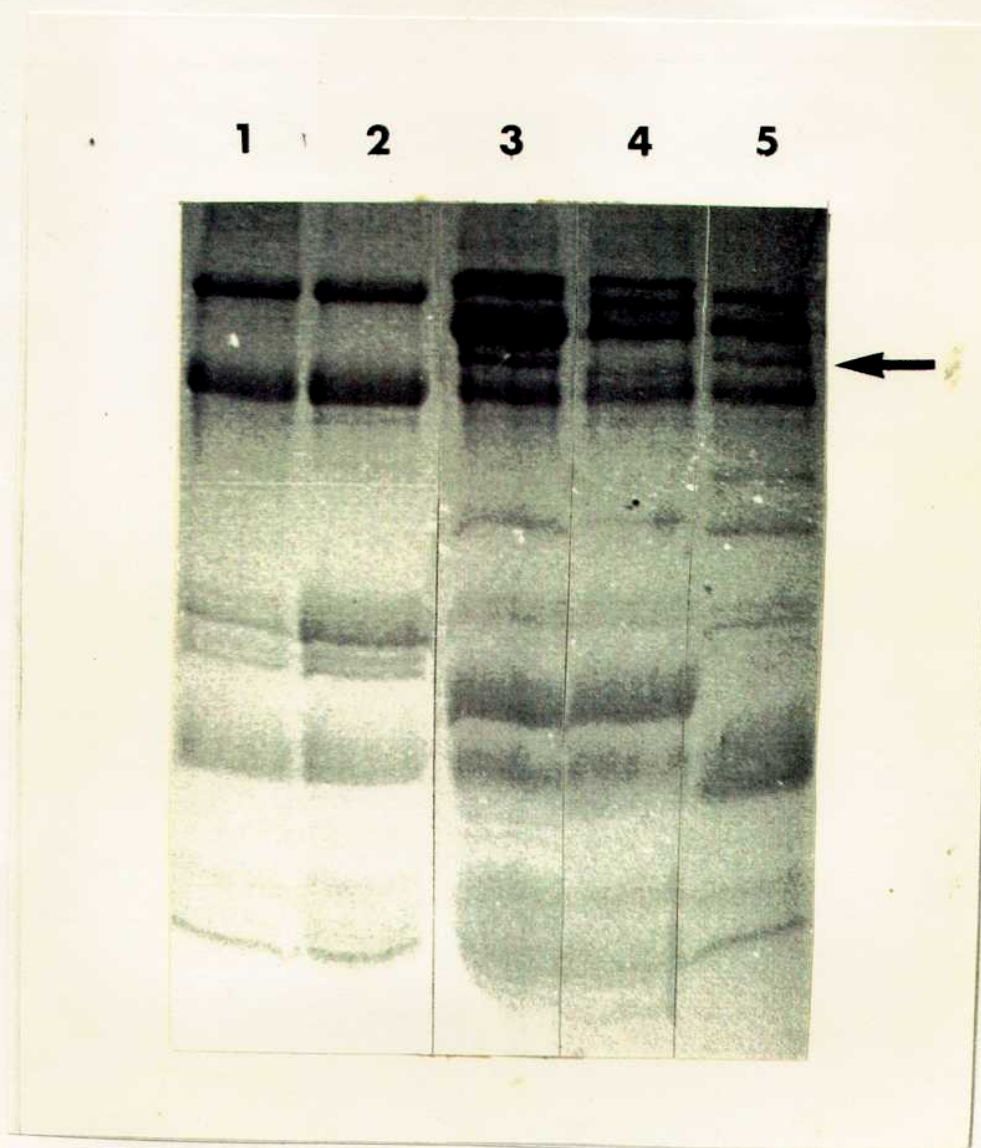
Ya se conocía que los patrones de gliadinas de Sinvalocho M.A. y su mutante Gamma 1R muestran diferencias en los patrones de gliadinas estando una de las bandas diferenciales asociada a uno de los genes de reacción al patógeno (Favret et al. 1969, Favret 1969).

En este trabajo se analizó el patrón de glutelinas de alto peso molecular de las líneas isogénicas Sinvalocho M.A. y Gamma 1R. En la figura 14 se observa el patrón electroforético de ambas líneas isogénicas en el que se destaca la existencia de una banda en Sinvalocho con una migración distinta de la que presenta la mutante Gamma 1R. Se corrió un control correspondiente a la línea Chinese Spring de la cual se cuenta con líneas de sustitución. Esta línea presenta 4 bandas de glutelinas de alto peso molecular. Para la localización cromosómica de la banda de diferente movilidad, se corrió una muestra correspondiente a la línea Chinese Spring sin el cromosoma 1B (por la literatura se conoce que esa banda está codificada en este cromosoma) con 4 dosis del 1D (Nuli 1B, Tetra 1D) y otra de Chinese Spring Monotelosómico para el

cromosoma 1B). En estas muestras no aparece la banda que se corresponde con la presente en Chinese Spring y que a su vez tiene la misma migración que la de Sinvalocho M.A. Para confirmar que también la banda de Sinvalocho está codificada en este cromosoma, se utilizaron líneas de sustitución cromosómica intervarietal, obtenidas por el Ing. Enrique Suárez-Inst. Recursos Biológicos, de Chinese Spring portadoras del cromosoma 1 B de Sinvalocho M.A. Los resultados indican que en este caso también se confirma que el gen que codifica la banda que difiere en movilidad entre las líneas cuasi isogénicas está localizado en el cromosoma 6B. En este cromosoma se localiza también el gen de reacción (Ao) a la raza FO₁ del patógeno.

Figura 14

Patrón electroforético de glutelinas de alto peso molecular en gel desnaturizante de poliacrilamida al 12 %.



6.2. Análisis de rearrreglos a nivel de DNA

En el laboratorio se cuenta con una serie de clones tanto de gliadinas como de glutelinas que se utilizaron para este análisis. El clon glia A207 fue gentilmente cedido por el Dr Okita, Wash. State University (ver Okita et al. 1982 y Materiales y Métodos).

En la sección Materiales y Métodos se describe el origen de la mutante Gamma 1R a partir de la variedad original, Sinvalocho M.A. El mismo se interpreta como el resultado de una transposición que involucra los mencionados genes de reacción afectando a su vez la expresión de los genes de proteínas de reserva (Favret 1969).

Con el objeto entonces de:

- * Analizar el efecto de la transposición genética postulada en este sistema, en cuanto a rearrreglos a nivel del DNA en la zona de interés.

- * Realizar la búsqueda de un marcador molecular a partir del cual encarar futuros experimentos de clonado de los genes de resistencia y/o susceptibilidad específicos por caminado cromosómico (Watson et al. 1983).

se realizó el siguiente experimento:

Se extrajo y purificó DNA de las dos variedades de trigo como se describió anteriormente. Se trataron 10 μ g de DNA de cada variedad por separado con dos enzimas de restricción: Hind III y Bam HI, también por separado. Se eligieron enzimas con bajo número de corte para este experimento para facilitar la comparación de los patrones de restricción de las dos variedades de trigo, ya que hay menos fragmentos de restricción capaces de hibridar.

Se corrió el DNA digerido en un gel de agarosa al 0,8% y se transfirió a nitrocelulosa mediante la técnica de Southern blot.

Se realizó la hibridación de este filtro usando como sonda a plásmidos marcados radiactivamente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP extraídos del clon glia A207 obtenido por Okita (Okita et al. 1982).

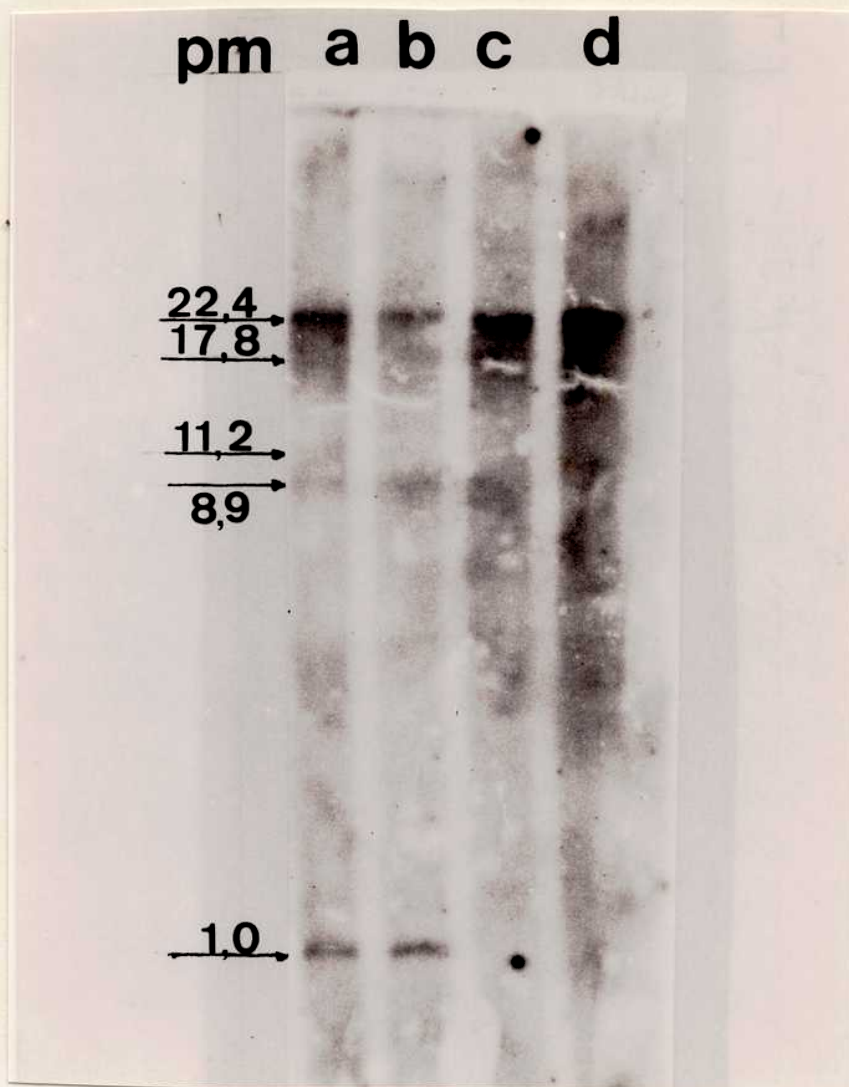
Debido a que los genes de gliadinas α/β de trigo están

genéticamente ligados a los genes de resistencia a roya, no sería extraño esperar, entonces, que los cambios en la secuencia de DNA de la región de interés producidos por las translocaciones y reordenamientos que dieron origen a la variedad Gamma 1R a partir de Sinvalocho M.A., se vean reflejados en cambios en los fragmentos de restricción que hibriden con la sonda usada.

El resultado se muestra en la siguiente figura.

Figura 15: DNA de ambas variedades de trigo cortado con dos enzimas de restricción distintas (por separado), corrido en gel de agarosa al 0,8%, transferido a nitrocelulosa e hibridado usando como sonda a plásmidos extraídos del clon Glía A207 marcado con ^{32}P -dCTP.

Calles: a) Sv-Hind III; b) Gamma-Hind III; c) Sv-Hinf I; d) Gamma-Hinf I.



El porcentaje de incorporación de nucleótidos fue del 20% y la actividad específica de la sonda de 107 cpm/ μg DNA.

Como se observa en la foto, hay 4 bandas de 22400, 17800, 8900 y 1000 pares de bases que son idénticas en ambas variedades cortadas con Hind III. Además aparece otra banda también de 22400 pb que es igual en ambas variedades cortadas con Hinf I. Sin embargo una banda de 11200 pb aparece cuando el DNA de Sinvalocho M.A es tratado con Hind III pero no aparece cuando el DNA de Gamma 1R es tratado con la misma enzima, indicando la existencia de reordenamientos estructurales o mutaciones en segmentos cromosómicos vecinos. Este fragmento podría servir, a su vez, como marcador molecular en experimentos de

caminado cromosómico.

7. CONSTRUCCION DE COLECCIONES DE cDNA

Del análisis de los cambios producidos a nivel de RNA mensajero, se puede inferir la posibilidad de clonar el cDNA correspondiente a estos mensajeros inducidos específicamente. Debido a que la interacción Gamma 1R-FO₁ fue la que presentó los cambios más conspicuos a nivel de mRNA, se eligió este sistema para realizar una colección de cDNAs. Paralelamente se construyó también una colección de cDNAs correspondiente al mRNA de la interacción Sinvalocho-FO₁. En ambos casos se partió de mRNA del tercer día del proceso de infección. Se utilizó como vector el fago lambda gt10 ya que se deseaba obtener una colección de cDNAs con un número alto de clones para aumentar la probabilidad de detectar algún clon diferencial.

7.1 Clonado en lambda gt10

7.1.1 Síntesis y fraccionamiento de cDNA

El cDNA obtenido como se detalla en Materiales y Métodos fue corrido en un gel alcalino de agarosa, habiéndose observado una población de moléculas de distinto tamaño con predominancia de aquellas que van de 9 a 4 kb (Figura 16). La cantidad de cDNA obtenida a partir de mRNA de Gamma 1R-FO₁ calculada como se detalló anteriormente, en base a las cpm precipitables en TCA, arrojó un valor de 170 ng:

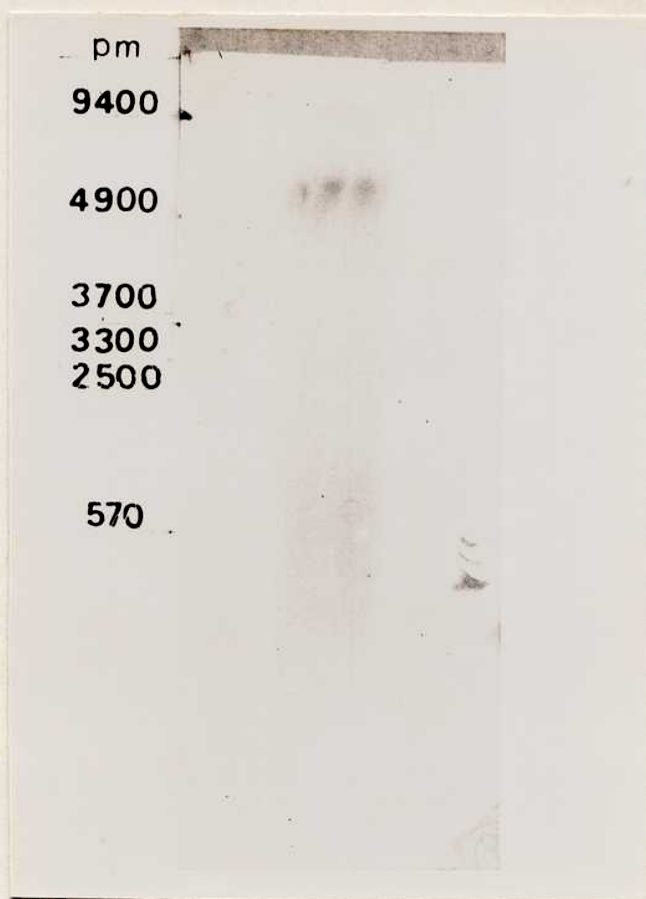
$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{cpm precipitables en TCA}}{\text{cpm totales}} = \frac{3700}{58200} = 0,6 \%$$

$$A = 0,06 \times 10 \text{ mmol} = 0,06$$

$$\text{ng cDNA} = 2 \times 350 \times 4 \times 0,06 = 168 \text{ ng}$$

Figura 16 : Electroforesis en gel alcalino del cDNA 2^o cadena.

Una alicuota del cDNA 2^o cadena marcado con ^{32}P dCTP se corrió en un gel de agarosa alcalino al 1 %. La autoradiografía se obtuvo por exposición del gel seco a una película Kodak X-Omat a -70°C . El tamaño de cDNA mayoritario está alrededor de 5 kb.



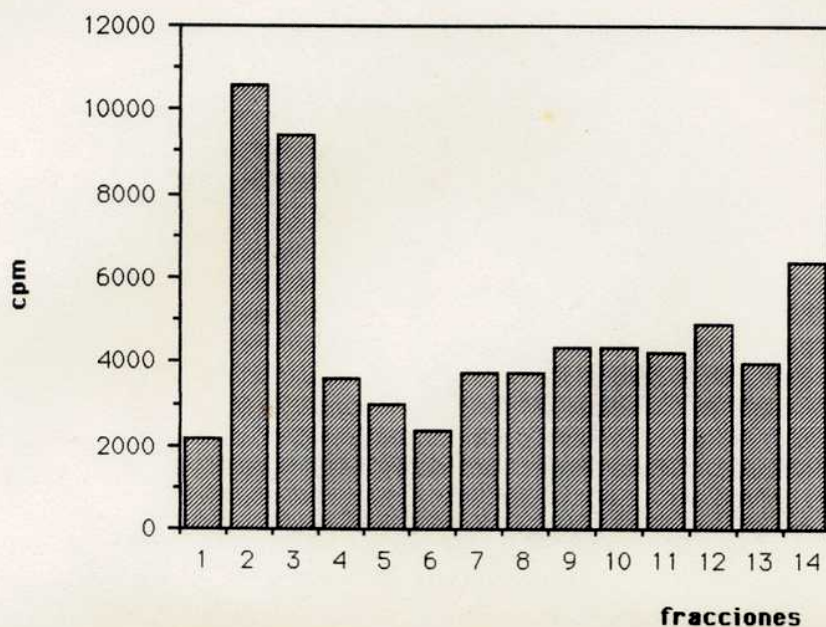
Se realizó un fraccionamiento del cDNA para clonar las fracciones de mayor peso molecular. En la figura 17 se observa dicho fraccionamiento. Se seleccionaron las primeras 3 fracciones y por otro lado las tres subsiguientes y fueron clonadas separadamente.

Figura 17 : Fraccionamiento del cDNA obtenido por tamaño.

El cDNA marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP se fraccionó en columna de Biogel A 50m.

A: Las fracciones recogidas se midieron en contador de centelleo líquido en Cherenkov. Se graficó el nº de cpm en función de las fracciones en orden correlativo.

B: Una alícuota de cada una de las fracciones se corrió en un gel alcalino. Se secó y se expuso el gel a película autoradiográfica.



7.1.2 Análisis de la colección de cDNA:

La colección de cDNA fue construida como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de clones recombinantes obtenida fue de $4,8 \cdot 10^4$ pfu/ 500 μ l.

El análisis de fagos recombinantes a través de la hibridación con filtros réplica con dos sondas, una del sistema Gamma 1R-FO₁ y otra de un sistema no inducido (Gamma 1R-Testigo o Sinvalocho M.A.-FO₁). Todos los clones positivos en Gamma 1R-FO₁ dieron señal positiva con Gamma 1R-Testigo o Sinvalocho M.A.-FO₁. Esto fue corroborado en un segundo análisis de las colecciones de cDNA. Se analizó aproximadamente un 80% de la colección de cDNA Gamma 1R-FO₁. Tampoco se detectaron clones diferenciales en la colección de Sinvalocho-FO₁.

Debido a que los RNA mensajeros buscados (correspondientes a las proteínas de 20,5, 24 y 32,5 kDa de Gamma 1R-FO₁) traducidos *in vitro* representan un bajo porcentaje de la población de RNA mensajeros totales hacia el tercer día del proceso de infección (menor a 0,01 %) es que la detección de los respectivos clones es poco probable. En base a estos resultados se probó una estrategia distinta consistente en la construcción de una colección de cDNAs diferencial que reduce el análisis de la búsqueda de clones diferenciales pues en teoría sólo se clona lo que es específico de la interacción de interés.

7.2 Construcción de una colección de cDNA diferenciales En la sección Materiales y Métodos se describió el procedimiento para la construcción de una colección de cDNA diferencial a partir de RNA mensajero de la interacción Gamma 1R-FO₁ del 5º día del proceso de infección. Para realizar la hibridación sustractiva se utilizó RNA mensajero de Gamma 1R inoculada sólo con talco. Se partió de mRNA del 5º día de infección pues la abundancia de los mensajeros de interés es mayor que en días anteriores (Figura Gamma 1R inoculada sólo con talco no presenta inducción de esos mRNA o los presenta en muy baja

proporción.

Se obtuvo aproximadamente 600 μg de cDNA segunda cadena calculado como se indicó anteriormente.

7.2.1. Hibridación sustractiva

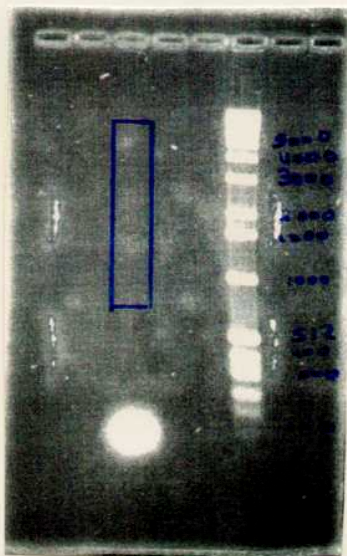
El arresto del cDNA primera cadena de Gamma 1R-FO₁ con el RNA mensajero no inducido, secuestra la mayor parte del cDNA, quedando como simple cadena sólo el mRNA diferencial (más del 95% de las cpm incorporadas al cDNA son removidas).

La Figura 18 muestra el gel en el cual se separó el cDNA a clonar del exceso de adaptadores y de moléculas de cDNA de bajo peso molecular. El cDNA en esta etapa ya no es detectable por tinción con Bromuro de etidio e iluminación con luz U.V. pues en esta etapa ya se efectuó la hibridación sustractiva habiendo quedado sólo un mínimo porcentaje (no más del 1%) del cDNA total.

Figura 18: Electroforesis del cDNA de Gamma 1R-FO₁ una vez arrestado con el mRNA de Gamma 1R testigo en gel de agarosa al 1%.

a: cDNA diferencial. No es visible con U.V. pues a lo sumo quedaron 6 μg de cDNA diferencial.

b: Marcador de peso molecular. En base al marcador de peso molecular se separó el cDNA desde alrededor de 500 bp hasta aproximadamente 4000bp. Esta fracción fue electroeluida de la agarosa.



7.2.2. Transformación

El porcentaje de religamiento del vector sólo fue aproximadamente del 20 % cuando se utilizó el cDNA como inserto y del 8% cuando se utilizó el inserto control.

Esto era esperable pues la cantidad de cDNA que se ligó al vector es menor incluso a la cantidad de inserto control (50 μ g). Si se obtuvieron aproximadamente 600 ng de cDNA doble cadena y suponiendo que un 1% corresponde al mRNA de interés, habría a lo sumo 6 ng de cDNA, una vez arrestado. Por ello no era esperable obtener un número de clones recombinantes elevado.

Se realizaron dos transformaciones, con los productos obtenidos de dos síntesis de cDNA obtenidos separadamente. Se obtuvieron 33 clones recombinantes de la primera transformación y 160 de la segunda.

7.2.3. Identificación de clones de cDNA diferencial

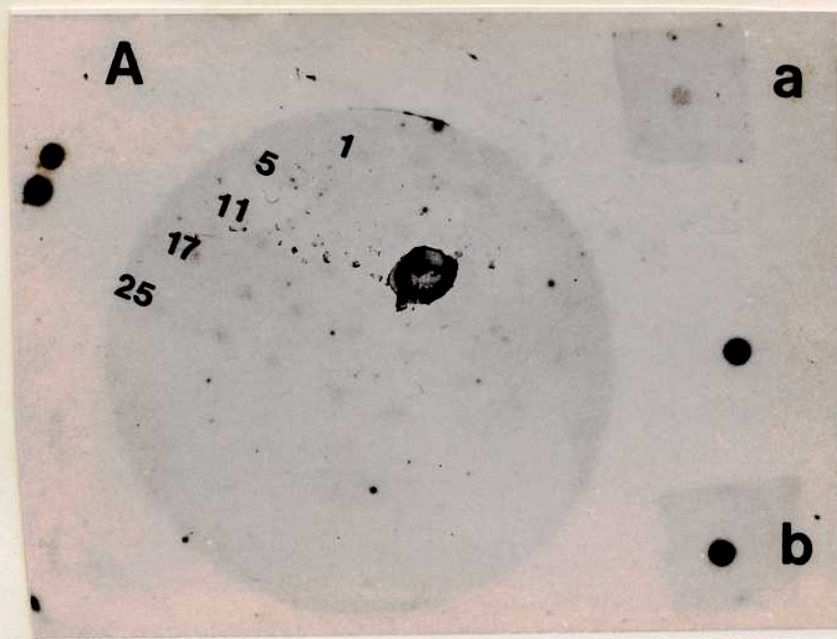
La búsqueda diferencial realizada con dos sondas diferentes dió como resultado que la mayoría de los clones obtenidos en la primera transformación dieron positivos, con ambas sondas. Sólo los clones pr14.1, pr15.1 y pr16.1 dieron positivos con al sonda de Gamma 1R-F0₁ y no con la sonda de Gamma 1R Testigo. (Figura 19). En este caso la actividad específica de las sondas utilizadas fue de 1.5×10^7 y 2×10^7 cpm/ μ g de mRNA templado.

Los experimentos de análisis de los clones recombinantes se repitieron, llegándose al mismo resultado. El clon pr14.1 es el que dio una señal más intensa con la sonda Gamma 1R-F0₁ que con la sonda Gamma 1R-Testigo, en un segundo análisis de los clones recombinantes (Figura 19). En este caso la actividad de la sonda fue de $9,4 \times 10^6$ y $1,9 \times 10^6$ cpm/ μ g de mRNA templado respectivamente. Como control negativo se utilizó un clon (23.1) portador del plásmido vector sin inserto. El hecho de que haya muchas colonias positivas con ambas sondas

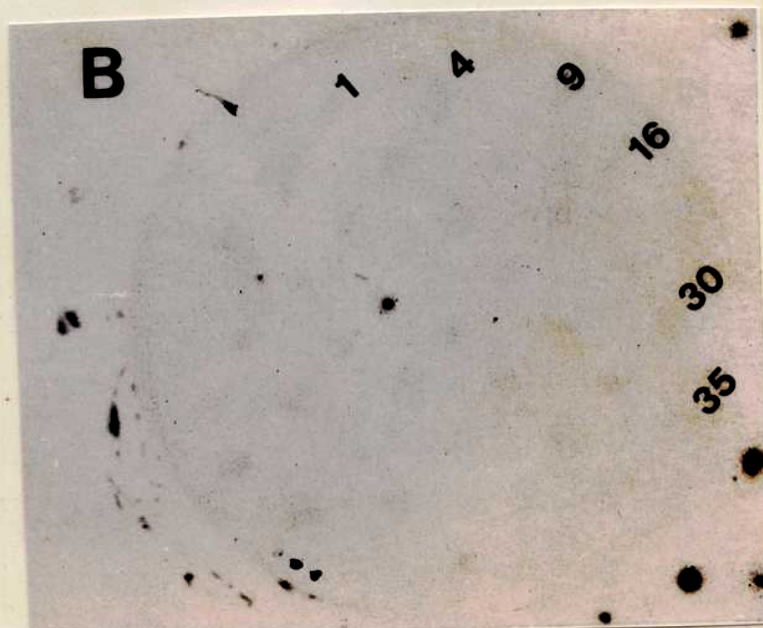
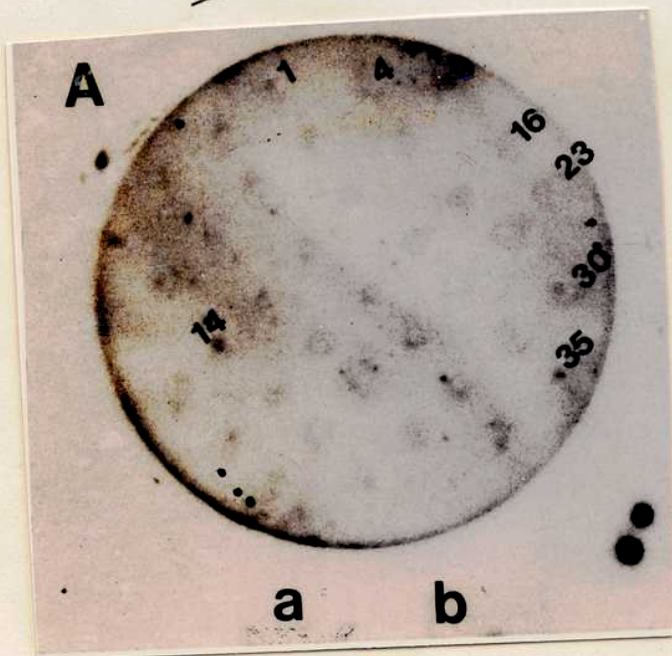
es un indicio de que la hibridación sustractiva no es 100 % efectiva y que quedan moléculas de cDNA sin arrestar que en realidad no son específicas del sistema Gamma 1R-FO₁. El análisis de los plásmidos obtenidos a partir de los clones pr 14I, pr15I y pr16I reveló que se trata de plásmidos con insertos grandes de alrededor de 9 kb (figura 20). Fueron cortados con Hind III y Xho I para liberar el inserto, obteniéndose varias bandas que indicaría la presencia de sitios de corte internos en el inserto (Figura 22, calle 3 y 4).

Figura 19: Análisis de la búsqueda diferencial de clones específicos del sistema Gamma 1R-FO₁. Filtros réplica fueron hibridados con las dos sondas: Gamma 1R-FO₁ y Gamma 1R-Testigo. Los filtros fueron lavados y expuestos a película autoradiográfica. La mayoría de los clones dieron señal positiva con ambas sondas excepto los clones pr14I; 15I y 16I. I: primer análisis. II: Segundo análisis. A: sonda gamma 1R-FO₁ B: sonda Gamma 1R testigo. a y b: controles positivos de las sondas Gamma 1R-FO₁ y Gamma 1R-Testigo, respectivamente (30 ng de mRNA de Gammá 1R). El clon 14 es el que dió una señal más positiva.

I.



II.



Por otra parte el análisis de 50 clones de la segunda colección de cDNA reveló que en este caso también la mayoría de los clones dan señal positiva con ambas sondas (Figura clones 1, 5, 6, 11, 12, 17, 18, 19, 25, 26, 27, 42 a 50). La actividad de las sondas fue de $2,3 \times 10^6$ cpm/ μ g de mRNA templado la de Gamma 1R-Testigo y $8,9 \times 10^6$ la de Gamma 1R-F0₁. Ciertos clones dieron señal más intensa cuando los filtros se hibridaron con la sonda Gamma 1R-F0₁ que con la sonda Gamma 1R-Testigo en relación al control negativo correspondiente al vector sin inserto (clon 23). Ejemplos de este tipo son los clones: 13, 14, 28, 29, 34, 35 y 36 (Figura 21).

Figura 20: Electroforesis de algunos de los plásmidos recombinantes obtenidos a partir de la primera transformación con cDNAs de Gamma 1R específicos digeridos con Hind III para linearizarlos. Los plásmidos digeridos con Hind III y no digeridos se corrieron en geles de agarosa 0,8 %(p/v).

a: marcador de peso molecular, b: p23 (control positivo), c: p23-Hind III, d: pr14, e: pr14-Hind III, f: pr15-Hind III, g: pr16-Hind III.

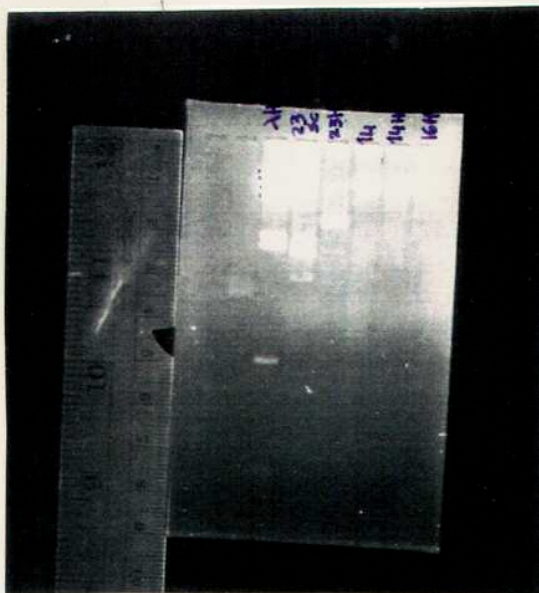
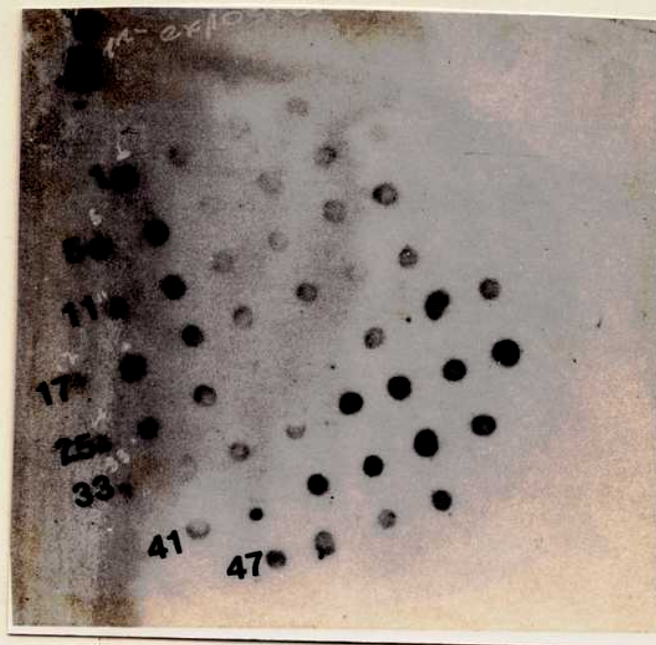
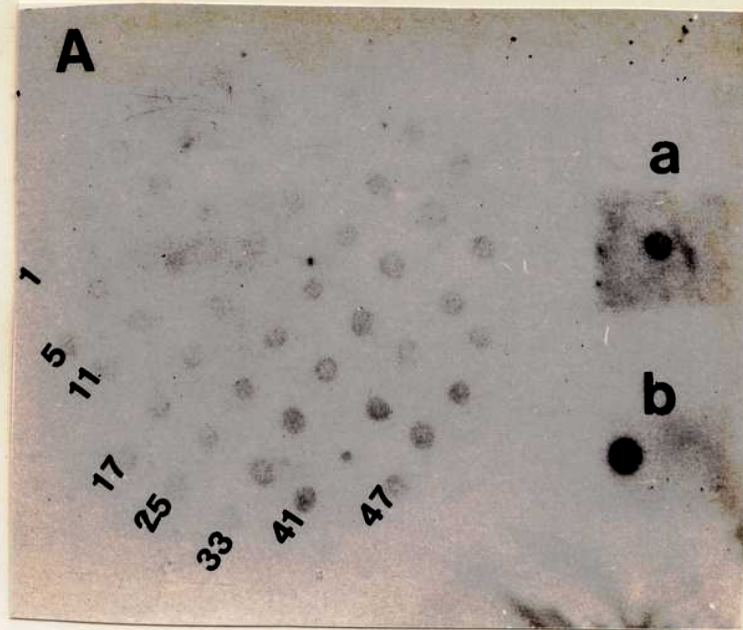


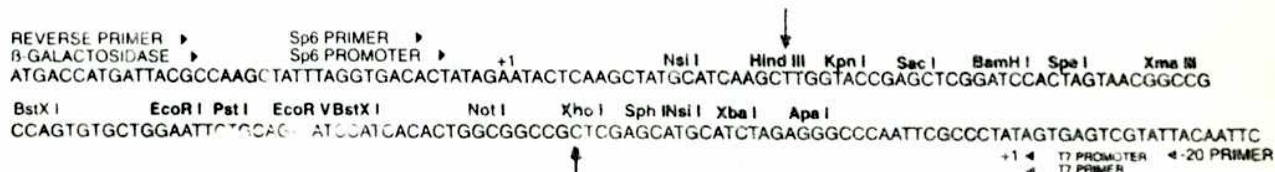
Figura 21: Análisis de la búsqueda diferencial de clones específicos del sistema Gamma 1R-FO₁ provenientes de la segunda transformación. Los clones señalados con (*) corresponden a los que dieron señal más intensa con la sonda de Gamma 1R-FO₁ que con la sonda de Gamma 1R-Testigo comparados con el respectivo control negativo (clon 23). A: sonda Gamma 1R-FO₁, B: sonda Gamma 1R-Testigo. ay b: controles positivos de las sondas Gamma 1R-FO₁ y Gamma 1R-Testigo respectivamente (30 ng de mRNA de Gamma 1R).



El análisis de los plásmidos recombinantes tanto de estos clones diferenciales como de los que dan señal positiva con ambas sondas se realizó en dos etapas. En primer lugar se digirieron con Hind III para linearizarlos (Figura 22A) y poder determinar el tamaño de los plásmidos recombinantes. De acuerdo a estos resultados aquellos que difirieron en movilidad del vector sin inserto (clon 23), se cortaron posteriormente con Xho I. Esta doble digestión está dirigida a liberar los insertos portados por estos plásmidos (Ver siguiente esquema).

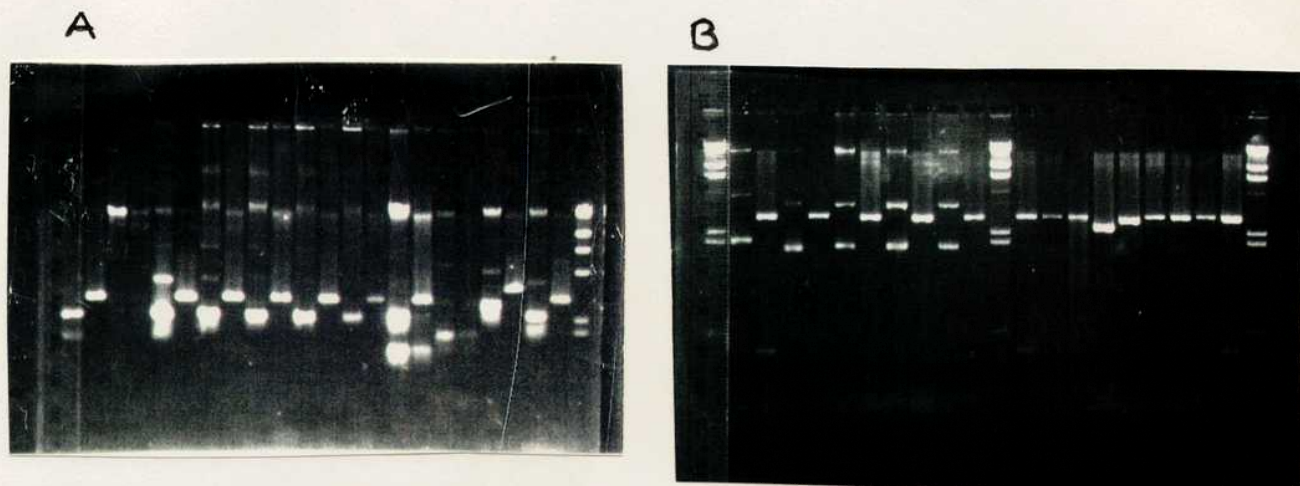
Esquema de los sitios de restricción enzimática de la región de inserción de los insertos de cDNA en el vector pcDNA II.

pcDNA II



El análisis de estos plásmidos doblemente digeridos corridos en geles de agarosa al 1% (p/v) demostró que algunos de ellos liberan insertos. Por ejemplo el plásmido pr14A diferencial libera un inserto de aproximadamente 400 pb. Otros plásmidos de los que daban señal positiva con la sonda Gamma 1R-F0₁, no liberaron inserto o los mismos no fueron visibles posiblemente porque se trate de insertos muy chicos. en gel de agarosa demostró que algunos de ellos liberan insertos. Los clones 11.2A y 50.2A no diferenciales, son portadores de inserto de tamaño similar al clon 14.2A diferencial (Figura 22 B).

Figura 22: Análisis de algunos de los plásmidos recombinantes en geles de agarosa 1% (p/v).



A: plásmidos digeridos con Hind III y Xho I (pr15I) o con Hind III para linearizarlos (resto de los plásmidos).

a: p23 (control negativo), b: p23-Hind III, c: pr 15I, d: pr15I-Hind III, e: pr 14I, f: pr 14I-Hind III, g: p3A, h: p3A-Hind III, i: p24A, j: p24A-Hind III, k: p10A, l: p10A-Hind III, m: p12A, n: p12A-Hind III, o: plrA, p: p15A-Hind III, q: p11A, r: p11A-Hind III, s: p25A, t: p25A-Hind III, u: marcador de peso molecular (Lambda Hind III).

B: plásmidos digeridos con Hind III y Xho I para liberar los insertos.

a: marcador de peso molecular (lambda Hind II), b: p11A, c y m: p11A-Hind III y Xho I, d: p23 (vector sin inserto), e y o: p23-Hind III, f: p43A, g y r: p43A-Hind III y Xho I, h: p48A, i y s: p48A-Hind III y Xho I, j: p49A, k y t: p49A-Hind III y Xho I, l: lambda Hind III, n: pr14A-Hind III y Xho I, p: p29A-Hind III y Xho I, q: p41A-Hind III y Xho I, u: p50A-Hind III y Xho I, v: lambda Hind III.

El haber detectado clones específicos de la interacción Gamma 1R-FO₁ implica un gran avance en el camino hacia el clonado del o los genes que intervienen en el reconocimiento específico hospedante-patógeno dado que los mismos podrían corresponder a dichos genes o a productos génicos tempranos inducidos por estos genes de reconocimiento.

DISCUSSION

1. SISTEMA TRIGO-ROYA DE LA HOJA COMO MODELO DE INTERACCIONES ALTAMENTE ESPECIFICAS

Los modelos moleculares acerca del reconocimiento específico entre hospedante y patógeno no han podido ser validados en la mayoría de los casos debido a falta de evidencias a nivel molecular de qué compuestos están siendo reconocidos, cuando los complejos génicos de hospedante y patógeno interactúan. Como se mencionara anteriormente se han detectado, en sistemas análogos al aquí estudiado, cambios en enzimas claves como RNA polimerasa II, ribonucleasas, inducción generalizada de RNAs y proteínas pero en la mayoría de los casos dichos cambios no han podido ser asociados con determinantes de especificidad (Chakravory y Shaw 1977). Esto ha sido consecuencia de la utilización de sistemas génicos con un fondo genético no homogéneo que no permiten asignar cambios a nivel proteico o de mRNA, a determinadas interacciones entre pares de genes de hospedante y patógeno. En muchos de los trabajos que reportan cambios polipeptídicos en hojas infectadas con roya, no puede hablarse de especificidad porque no se han comparado combinaciones compatibles e incompatibles (Yamamoto y Tani 1979; Pure et al. 1979). En pocos casos se han detectado (von Broembsen y Hadwiger, 1972) proteínas específicas de determinadas interacciones H-P o inducción o disminución en la traducibilidad de RNAs mensajeros específicos (Manners y Scott, 1985).

Por lo expuesto resulta sumamente interesante el estudio de este sistema, bien caracterizado desde el punto de vista genético, que permite asignar determinados cambios polipeptídicos y/o de RNA mensajeros a determinada interacción de genes (uno del hospedante y uno del patógeno).

2. SINTESIS DE POLIPEPTIDOS RELACIONADOS CON LA REACCION A PATOGENOS.

Los ensayos de curvas de tiempo de la expresión de los genes involucrados en la interacción hospedante-patógeno trigo-roya de la hoja, demuestran que los primeros cambios polipeptídicos reproducibles ocurren hacia el tercer día del proceso de infección tanto en interacciones compatibles como incompatibles. Este es un período relativamente temprano si se considera que el proceso de germinación de esporas, entrada por estomas de las hifas resultantes hasta la formación de los apresorios en las primeras células lleva dos días y que los primeros síntomas de hipersensibilidad en el caso de resistencia son evidentes recién el día 7 posterior a la inoculación y la aparición de pústulas ocurre recién hacia el décimo día en plantas susceptibles. El tiempo de aparición de éstos cambios concuerda con evidencias reportadas en sistemas análogos (Pure et al. 1987). Si bien desde el punto de vista sintomático la expresión de la incompatibilidad es tardía de acuerdo a la clasificación de Rohringer y Heitefuss (1984) con síntomas de hipersensibilidad a los siete días después de la inoculación (en plantas creciendo entre 20 y 22 °C) se detectan cambios polipeptídicos con varios días de anterioridad.

Es interesante destacar que los cambios polipeptídicos acaecidos pudieron detectarse con pulsos de marcación con ³⁵S-Metionina en proteínas sintetizadas "de novo" y que no fue posible detectarlos en patrones electroforéticos de proteínas totales, por métodos de tinción con Azul brillante de Coomassie R. Esto indica que la inducción/degradación de proteínas es baja en términos cuantitativos. A pesar de ello, la tasa de síntesis proteica en plantas inoculadas con roya estimada en base a los datos de porcentaje de incorporación de radiactividad a los polipéptidos sintetizados "de novo", varía significativamente respecto a los de las plantas control. Este incremento en la tasa de síntesis proteica fue similar en

interacciones compatibles e incompatibles que involucraban a las razas FO₁ y FO₃. El aumento en la tasa de síntesis proteica fue detectado también en otros sistemas hospedante-patógeno específicos (Manners et al. 1985; Pure et al. 1979; Von Broembsen y Hadwiger 1972; Yamamoto y Tani 1982).

Si bien en estos otros sistemas se ha detectado inducción o disminución en la síntesis proteica (Manners et al. 1985; Pure et al. 1979; Vanderplank 1984; von Broembsen y Hadwiger 1972; Schweizer et al. 1989) dichos cambios no han podido adjudicarse de forma unívoca a genes de reacción al patógeno debido a diferencias en el fondo genético de hospedante y/o patógeno. El sistema utilizado en el presente trabajo permite adjudicar cambios polipeptídicos a interacciones génicas específicas. Así, los polipéptidos de 15 kDa (fracción particulada) y 85 kDa (fracción soluble) están asociados a la interacción de los genes A₁/A₂ del hospedante Gamma 1R y los genes de virulencia p₁ y p₂ del clon FO₁ del patógeno. Esto sugiere que los productos de ciertos genes, en este caso de los genes A₁/A₂ serían esenciales para el desarrollo de la enfermedad. Esta hipótesis concuerda con el modelo negativo de reconocimiento descrito en la introducción. En el sistema tomate-Cladosporium fulvum se describió la inducción de una proteína específica relacionada a la interacción de una variante fisiológica del hospedante y un biotipo del hongo (De Witt et al. 1988). Por otra parte en esta misma interacción una banda de 52 kDa disminuye específicamente en intensidad por lo que podría inferirse que un producto constitutivo de la línea Gamma 1R está siendo degradado en forma específica o su síntesis siendo disminuída específicamente cuando la planta se inocula con el clon FO₁. En este caso la disminución en la cantidad de proteína favorecería directa o indirectamente el desarrollo del patógeno. La misma consideración puede hacerse para la banda de 28 kDa en la interacción Sinvaloch M.A.-FO₃. En este caso, los genes interactuantes son A₀ en el hospedante y el gen de virulencia p₀ en el patógeno. Manners y Scott (1985), también detectaron supresión de la síntesis de

determinados polipéptidos en el sistema cebada-Erisyphe graminis f.sp. hordei.

Se detectó también un cambio polipeptídico específico en una interacción incompatible. Hay supresión de la síntesis de un polipéptido de 37 kDa en la interacción incompatible Sinvalocho M.A.-FO₁. En este caso, el reconocimiento específico estaría dado por el gen A₀ y el gen de avirulencia P₀. Este resultado sugiere que la inhibición de la función génica o la degradación de proteínas específicas puede estar involucrada en la resistencia de Sinvalocho M.A. al clon FO₁. Podría ser una proteína necesaria para el desarrollo de esta raza del patógeno y su supresión específica podría impedir el desarrollo ulterior del hongo. No se detectaron inducciones específicas de incompatibilidad ya que la banda de 39 kDa se induce en forma simultánea en dos interacciones incompatibles: Gamma 1R-FO₃ y Sinvalocho M.A.-FO₁, donde distintos genes intervienen en el reconocimiento. Por lo tanto podría tratarse de un polipéptido no específico, asociado probablemente con mecanismos secundarios de respuesta general. Este tipo de inducción no específica es común a otros sistemas análogos descritos como trigo-Erisyphe graminis f.sp. tritici (Schweizer et al. 1989) y cebada-Erisyphe graminis f.sp. hordei (Davidson et al. 1988).

Otro caso de variación aparentemente inespecífica es la banda de 23 kDa que disminuye en intensidad en las interacciones Sinvalocho-FO₂ (incompatible) y Sivalocho M.A.-FO₃ (compatible). Sin embargo como se ha verificado que mutantes espontáneas susceptibles a FO₂ simultáneamente se vuelven resistentes a FO₃ (Suárez comunicación personal) y probablemente esté involucrado el gen P₂ del patógeno en este reconocimiento, la banda de 23 kDa podría en realidad ser específica y estar relacionada con este gen del patógeno.

3. TRANSCRIPCIÓN DE RNA MENSAJEROS EN HOJAS INOCULADAS CON ROYA

De la detección de cambios polipeptídicos en proteínas sintetizadas "de novo" no puede inferirse una activación o supresión génica en forma conclusiva pues los cambios encontrados podrían responder a cambios post-traduccionales (degradación, modificación de proteínas preexistentes, etc.). Para probar si hay expresión génica diferencial se realizaron estudios a nivel de RNA mensajeros en ensayos de traducción "in vitro". Para ello se repitió el esquema de ensayos comparativos de distintas interacciones pero con RNA extraído a distintos tiempos después de la infección.

Los patrones electroforéticos de polipéptidos sintetizados "in vitro" a partir de RNA de plantas de Gamma 1R inoculadas con el clon FO₁ a través del tiempo, comparados con el control sin infectar, muestran cambios significativos en varias bandas. Los primeros cambios se detectaron hacia el tercer día del proceso de infección en concordancia con los experimentos de marcación "in vivo". La inducción más notable corresponde a un polipéptido de 32,5 kDa que se induce levemente hacia el tercer día pero su intensidad es mucho mayor hacia el día 5 y 7. El hecho que estos dos polipéptidos aumenten notablemente su intensidad hacia el final del proceso de infección, podría hacer pensar que se trata de productos del hongo, pues la intensidad de banda es proporcional al desarrollo del mismo. Sin embargo, estos dos polipéptidos están presentes también, aunque con menor intensidad, en Sinvalocho M.A.-FO₁; esto indicaría que por lo menos en Sinvalocho M.A. estos polipéptidos son productos de la planta pues el hongo en las interacciones incompatibles presenta un crecimiento limitado.

En correspondencia con experimentos de marcación de proteínas "in vivo", hay mRNAs que están menos representados o la traducción de proteínas a partir de ellos es menos eficiente en ciertas interacciones como el caso del mRNA que codifica el polipéptido de 34 kDa en la interacción Gamma

1R-FO₁, especialmente en estadios avanzados del proceso de infección (a partir del cuarto día).

El estudio de la especificidad de estos cambios a nivel de RNA mensajero, incluyendo las seis interacciones disponibles, indica que por lo menos dos polipéptidos sintetizados "in vitro" a partir de mRNAs se inducen específicamente, uno en compatibilidad (banda de 24 kDa en Gamma 1R-FO₁) y uno en incompatibilidad (Banda de 21,5 kDa en Sinvaloch M.A.-FO₂). En el caso del mRNA codificante para este último polipéptido, el mismo es activo en todas las interacciones que involucran a Gamma 1R incluyendo plantas control. Esta expresión diferencial entre Gamma 1R y Sinvaloch M.A. en plantas no infectadas con roya, podría deberse a algunas de las pocas diferencias del hospedante. Alternativamente el gen A_o de Sinvaloch M.A. podría o bien modular la expresión de un gen que se exprese constitutivamente en Gamma 1R o bien la síntesis de este polipéptido de 21,5 kDa podría estar normalmente suprimida en Sinvaloch M.A. y la infección con FO₂ induciría específicamente la transcripción de los RNAs mensajeros.

Los experimentos de traducción de mRNA "in vitro" además de corroborar que por lo menos algunos de los cambios polipeptídicos detectados "in vivo" pueden deberse a cambios a cambios en los niveles de RNAs mensajeros en ciertas interacciones hospedante-patógeno específicas, permitieron establecer asociación de inducción de RNA mensajeros con la raza FO₁ del patógeno, independientemente del tipo de interacción. En este último caso, este producto específico de raza, podría ser inducido por el hongo o ser directamente un producto del hongo que no determina tipo de interacción o es un mecanismo de respuesta secundario. Esto es válido para las bandas de 20,5 y 32,5 kDa, que se inducen con mayor intensidad en periodos del proceso de infección (días 5 y 7).

Igual que en los ensayos de síntesis de proteínas "de novo" ciertas bandas se inducen en más de una interacción, como la banda de 13,5 y 14,5 kDa en las interacciones incompatibles Gamma 1R-FO₃ y Gamma 1R-FO₂. Esto podría ser

interpretado como una respuesta de resistencia general como la mencionada para la banda de 39 kDa en los experimentos "in vivo". Por otro lado, en Gamma 1R uno de los genes de reacción al clon FO₂ (A₂) es el mismo que confiere resistencia al clon FO₃ (Tabla 1). Esto significa que las bandas de 14,5 y 13,5 kDa pueden ser productos de una inducción específica del mRNA codificado por este gen A₂. El gen que codifica el polipéptido de 13,5 kDa se expresa constitutivamente en Sinvalocho M.A. a diferencia de lo que ocurre en Gamma 1R. Las mismas consideraciones hechas para la banda de 21,5 kDa en Sinvalocho M.A.-FO₂ son válidas para este caso.

La banda de 14,5 kDa presenta un comportamiento más complejo y su interacción no es tan sencilla. La intensidad de esta banda disminuye en las interacciones Sinvalocho M.A.-FO₂ (incompatible) y Sinvalocho M.A.-FO₃, mientras que aumenta en las interacciones incompatibles Gamma 1R-FO₂ y Gamma 1R-FO₃. Esta variación

simultánea en uno y otro sentido en la radiactividad asociada a esta banda en todas las interacciones que involucran al gen P₂ del patógeno sugieren que este gen estaría involucrado en la inducción del mRNA activo para esta banda. Sería un caso análogo a la banda de 23 kDa descrito en los experimentos "in vivo".

El hecho de que algunos RNAs se induzcan o su traducción disminuya en más de una interacción a la vez, podría responder a un mecanismo de respuesta secundario, como se planteó anteriormente. El mecanismo de respuesta secundario más conocido y que está siendo estudiado en varios sistemas hospedante-patógeno es la inducción de PRs o proteínas relacionadas con la patogénesis (Mauch y Staehelin 1989, Benhamou et al. 1989). En el sistema aquí analizado, las inducciones inespecíficas (bandas de 39, 22 y 23 kDa) o las específicas de raza pero no de interacción (bandas de 32,5; 20,5; 13 y 14,5 kDa), podrían ser candidatos a formar parte de este grupo de proteínas PR. Pero el análisis de las proteínas de la fracción ácida demuestra que un sólo polipéptido se induce en la interacción Gamma 1R-FO₁, y en estadios muy

avanzados del período de infección. Se puede concluir entonces que los cambios polipeptídicos y de RNA mensajeros tempranos, detectados en este sistema, no corresponden a proteínas de respuesta secundaria del tipo de las conocidas como PRs.

4. DIRECCION DE LOS CAMBIOS POLIPEPTIDICIS Y DE RNA ESPECIFICOS.

Como cita Danman (1987) en su discusión acerca de si la especificidad es hacia compatibilidad o incompatibilidad, hay diversidad de opiniones entre diferentes autores. La mayor parte de las líneas de evidencia, como se mencionara en el punto 5.1.1. de la Introducción, fundamentarían el reconocimiento para incompatibilidad en sistemas hospedante-patógeno altamente específicos que involucran patógenos como royas. Estos autores sostienen que los sistemas que involucran producción de toxinas y que avalan el reconocimiento para compatibilidad (VanderPlank 1984) no son comparables a los sistemas de reacción "gen a gen" o "alelo a gen". En general también se sostiene que los sistemas hospedante-patógeno, en los que existen respuestas del hospedante como producción de fitoalexinas, lignificación, etc., no responden al tipo de relación hospedante-patógeno específicas. Sin embargo, hay sistemas que involucran royas y en los cuales hay producción de fitoalexinas (trigo-*P. striiformis*, Cartwright y Rusel, 1980) y Avena-*P. coronata*, Mayama et al. 1980, 1982) y lignificación (trigo-*P. graminis f.sp. tritici*, Beardmore et al. 1983). Lo que probablemente ocurre es que la producción de estas sustancias no sea específica, que sea un paso secundario producto del metabolismo de la planta inoculada con la raza incompatible del patógeno, una vez establecido el primer reconocimiento hospedante-patógeno.

En el sistema aquí estudiado hay ejemplos claros de inducciones específicas en compatibilidad e incompatibilidad. También hay disminuciones específicas en ambos tipos de

interaccion. De esto podría inferirse que habría reconocimiento en ambos sentidos. Por otra parte, aparentemente un mismo gen del hospedante podría por un lado inducir la síntesis de un producto (p.e banda de 15 kDa y banda de 85 kDa) que permita el desarrollo del patógeno en el hospedante compatible (Gamma 1R) al interactuar con el correspondiente gen de virulencia. Por otro lado el mismo gen induciría disminución específica de una proteína (banda de 52 kDa) que se expresa constitutivamente favoreciendo también el desarrollo del hongo. A continuación se resumen las bandas que han podido ser asignadas específicamente a pares de genes interactuantes.

5. CLONADO DE cDNA DIFERENCIALES INDUCIDOS EN UNA INTERACCION COMPATIBLE

La detección de cambios a nivel de RNA mensajeros en diferentes interacciones gen a gen en estudio permitió evaluar la factibilidad de clonar los cDNAs correspondientes a esos mRNAs específicos y elegir la interacción más adecuada para ello. Con respecto a este último punto se seleccionó la interacción Gamma 1R-FO₁ hacia el 5º día del proceso de infección pues fue la que presentó cambios más conspicuos a nivel de RNA mensajeros específicos tanto de interacción como de raza.

A partir de esta interacción se aislaron al menos 10 clones diferencialmente inducidos con respecto al control Gamma 1R no infectado. Estos clones pueden codificar tanto para proteínas específicas (como la de 24 kDa) o proteínas inducidas por la raza FO₁ (20,5 y 32,5 kDa). También podrían codificar para la proteína de 34 kDa cuya síntesis disminuye drásticamente en el control sin inocular mientras que continúa sintetizándose activamente en Gamma 1R inoculada con el clon FO₁ hacia el día 5 del proceso de infección. Del análisis de especificidad de los cambios encontrados en estas líneas isogénicas, discutido en las secciones anteriores, se

desprende la alta probabilidad de que estos clones porten secuencias intervinientes en el reconocimiento gen a gen de hospedante y patógeno (genes A₁/A₂) o de secuencias inducidas en forma temprana por dicho reconocimiento.

Hasta el presente no se reportó que haya podido aislarse en plantas clones de cDNA específicos intervinientes en el reconocimiento entre hospedante y patógeno ya sea en sistemas compatibles o incompatibles. En bacterias se ha clonado y caracterizado un gen de avirulencia de Pseudomonas syringae pv. glycinea (Staskawicz et al. 1984) que induce incompatibilidad en soja a través de la producción de un agente desencadenante de la reacción hipersensible (Keen et al. 1990). También se han clonado genes de avirulencia de Pseudomonas syringae pv. tomatoe que confieren especificidad de cultivar en soja (Kobashi et al. 1990). En cambio en hongos no han podido aún clonarse genes de "avirulencia" o "virulencia".

En trigo, en un sistema hospedante-patógeno específico constituido por trigo y oídio (Erysiphe graminis) se aislaron clones de cDNA que codifican para una peroxidasa (Rebmann et al. 1991). En este caso se trata de una proteína relacionada con la patogénesis que es inducida en trigo por un patógeno avirulento (E. graminis hordei) y que confiere incompatibilidad a un patógeno virulento (E. graminis tritici). Este no sería el caso de los clones de cDNA aislados en el presente trabajo ya que los productos codificados por ellos no responden a este tipo de inducción no específica.

Los clones aislados en este trabajo podrían ser utilizados como sondas en colecciones de cDNA genómico para llegar a aislar los genes correspondientes. La simultánea detección de marcadores genéticos ligados a los genes de reacción al patógeno constituye una alternativa para llegar a estos genes que intervienen en interacciones de tipo gen a gen. En este caso se detectó a nivel de DNA una banda diferencial en el patrón de restricción de ambas líneas isogénicas utilizando un clon de gliadinas. Al estar los genes de gliadinas ligados estrechamente a los de reacción a roya, podría utilizarse este

marcador para llegar por caminado o saltado cromosómico a los genes de interés.

Tanto la caracterización de inducción/represión a nivel proteico y a nivel de mRNA, como el aislamiento de clones diferenciales en un sistema compatible constituyen importantes avances en el estudio del reconocimiento entre hospedante y patógeno y son elementos cruciales para el aislamiento y posterior estudio de expresión de genes de reacción a patógenos, en particular genes de reacción a roya de la hoja. La caracterización de los promotores de genes que se inducen como respuesta a patógenos constituye, por sí misma, un objetivo de interés teórico y también práctico para su uso en la construcción de quimeras genéticas para la expresión de construcciones con secuencias estructurales foráneas. Estos promotores podrían ser más eficientes que la utilización de promotores de genes relacionados con la síntesis de etileno que se usan actualmente en este contexto.

PATOGENO

Alelos\genes	FO ₁	FO ₂	FO ₃	FO ₄	FO ₅
H	A ₁ /A ₁				
C			>15 kDa ^m		
S			>95 kDa ^m		
P			<52 kDa ^m		
E			>24 kDa ^m		
D			<34 kDa ^m		
A			[+]		
N					
T	A ₁	<37 kDa ^m		>21.5 ^m	<28kDa ^m
E				[-]	[+]

^m: polipeptidos sintetizados "in vivo"
^m: polipéptidos sintetizados "in vitro"
 > : incrementos en intensidad de banda
 < : disminución en intensidad de banda
 [+]: reacción compatible
 [-]: reacción incompatible

CONCLUSIONES

- Los primeros cambios en los patrones polipeptídicos tanto en interacciones hospedante-patógeno compatibles como incompatibles ocurren hacia el tercer día del proceso de infección, siendo esta una etapa temprana en el desarrollo de esta enfermedad.

- Se han podido identificar polipéptidos cuya intensidad incrementa o disminuye en forma específica en determinadas interacciones compatibles e incompatibles. Estos polipéptidos son candidatos a jugar un papel importante en las etapas tempranas de reconocimiento.

- Los estudios a nivel de RNA mensajero han corroborado que por lo menos algunos de los cambios proteicos detectados en los experimentos "in vivo" se deben a cambios en los niveles relativos de RNA mensajeros en determinado momento del proceso de infección. El período en que ocurren estos cambios a nivel de mRNA coincide con los de los polipéptidos marcados "in vivo" (tercer día).

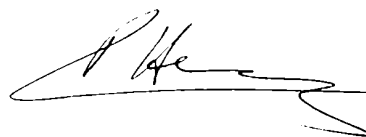
- Los cambios polipeptídicos descritos en este trabajo no responden a cambios usualmente inducidos en forma inespecífica en interacciones incompatibles como la producción de proteínas PR.

- La utilización de un sistema genéticamente definido permitió adjudicar determinados cambios polipeptídicos a la interacción de pares de alelos/genes de hospedante y patógeno.

- Los cambios proteicos y de RNA mensajeros detectados en el sistema trigo-roya de la hoja, indicarían que parece haber reconocimiento tanto para compatibilidad como para incompatibilidad según los genes interactuantes. Asimismo la expresión final del tipo de interacción puede deberse a la inducción (modelo positivo) o a la represión (modelo negativo) de productos específicos.

- Se identificó un marcador **génico** correspondiente a una **secuencia** codificante de una proteína de reserva (**gliadina**) que está ligada a alguno de los **genes** de reacción a roya de la hoja.

- Se aislaron clones de cDNA diferenciales correspondientes a RNA mensajeros inducidos en el sistema compatible Gamma 1R-FO₁ hacia el día 5 del proceso de infección que codificarían para polipéptidos específicos de interacción o específicos de raza.



BIBLIOGRAFIA

Albersheim, P y Valent, B.S. (1978). Host-pathogen interactions in plants. *J. Cell Biol.* 78, 627-643.

Altman, E., Altman, R.K., Garret, J.M., Grimaila, R.J. y Young, R. (1983). S gene product: identification and membrane localization of a lysis control protein. *J. Bacteriol.* 155, 1130-1137.

Antoniw, J.F. y White, R.F. (1983). Biochemical properties of the pathogenesis-related proteins from tobacco. *Neth. J. Plant Pathol.* 89, 255-264.

Ashby, A.M., Watson, M.D. y Shaw, C.H. (1987). A Ti-plasmid determined function is responsible of chemotaxis of Agrobacterium tumefaciens towards the plant wound product acetosyringone. *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 189-192.

Bahamish, H.S. y Wood, R.K. (1985). Induction of susceptibility and resistance of wheat leaves by preinoculation with high and low virulence races of Puccinia recondita f. sp. tritici. *Phytopath. Z.* 115, 97-112.

Beardmore, J., Ride, J.P. y Granger, J.W. (1983). Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 209-220.

Bell, J.N., Ryder T.B., Wingate, V.P., Bailey, J.A. y Lamb, C.J. (1986). Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and an incompatible plant-pathogen interaction. *Mol. Cell Biol.* 6, 1615-1623.

Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A. and Legrand, M. (1989). Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *The Plant Cell* 1, 1209-1221.

Biffen, A. (1907). Studies on the inheritance of disease resistance. *J. Agr. Sci.* 2, 109-128.

Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reimann, P., Schrader, G., Barkholly, and Appel, H. (1988). Leaf specific thioninins of barley- A novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. *The Embo Journal.* 7, 1559-1565

Bol, J.F., Hooft van Huijsduijnen, R.A., Cornelissen, B.J., van Kan, J.A. (1987). Characterization of pathogenesis-related proteins and genes. *En: Plant Resistance to viruses*. Editado por Wiley y Chichester (IBA Found. Symp.) pp 72-91

Boller, T., Gheri, A., Mauch, F. y Vögeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157, 22-31.

Boller, T. y Vögeli, U. (1984). Vacuolar localization of ethylene-induced chitinase in bean leaves. *Plant Physiol.* 63, 1123-1132.

Boller, T. (1985). Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. *En: Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. Editado por J.L.Key and T. Kosuge pp. 247-262, Alan R. Liss, New York.

Bonner, W.M. y Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.

Browder, L.E y Eversmeyer, M.G. (1986). Parasite-host specificity and resistance/susceptibility, two concepts, two perspectives. *Phytopathology* 76, 379-381.

Busnell, W.R, y Rowell, J.B. (1981). Suppressors of defense reactions: A model for roles in specificity. *Phytopathology* 71, 1012-1014.

Campbell, G.K. y Deverall, B.J. (1980). The effects of light and a photosynthetic inhibitor on the expression of the Lr20 gene for resistance to leaf rust in wheat. *Physiol. Plant Pathol.* 16, 415-423.

Cartwright, D.W. y Russell, G.E. (1980). Possible involvement of Phytoalexins in durable resistance of winter wheat to yellow rust. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 76, 323-325.

Chakravorty, A.K. y Shaw, M. (1977). Possible molecular bases for obligate host-pathogen interactions. *Biol. Rev.* 52, 147-179.

Chakravorty, A.K. y Shaw, M. (1977). The role of RNA in host-parasite specificity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15, 135-151.

Chakravorty, A.K., Shaw, M. y Scrubb, L.A. (1974a). Ribonuclease activity of wheat leaves and rust infection.

Nature 247, 577-580.

Chakravorty, A.K., Shaw, M. y Scrubb, L.A. (1974b). Changes in ribonuclease activity during rust infection, I. Characterization of multiple molecular forms of ribonuclease from flax rust grown in host-free media. *Physiol. Plant Pathology*. 4, 313-334.

Chakravorty, A.K., Shaw, M. y Scrubb, L.A. (1974c). Changes in ribonuclease activity during rust infection, II. Purification and properties of ribonuclease from healthy and infected flax cotyledons. *Physiol. Plant Pathol.* 4, 335-358.

Chakravorty, A.K., Simpson, R.S. y Scott, K.J. (1980). Messenger and ribosomal RNA hydrolisis by ribonuclease II. *Plant Cell Physiol.* 21, 425-432.

Chua, N. H., y Bennoun, P. (1975). Thylacoid membrane polypeptides of Chlamidomonas reinhardtii wild type and mutant strains deficient in photo system II reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 2175-2179

Collinge, D.B. y Slusarenko, A.J. (1987). Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Mol. Biol.* 9, 389-410.

Damann, K.E. (1987). Where is the specificity in gene-for-gene systems ?. *Phytopatology* 77, 55-56.

Daly, J.M. y Knoche, H.W. (1980). The chemistry and biology of pathotoxins exhibiting host-selectivity. *Adv. Plant Pathol.* 1, 83-136.

Davidson, A.D., Manners J.M., Simpson, R.S. y Scott, K.J. (1989). Altered host-pathogen expression in near-isogenic barley conditioned by different genes for resistance during infection by Erysiphe graminis f. sp. hordei. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 32, 127-139

Deverall, B.J. y Deakin A.L. (1985). Assesment of Lr20 gene-specificity of symptom elicitation by intercellular fluids from rust-infected wheat leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 27, 99-107

De Wit, P.J. y Spikman, G. (1982). Evidence for the occurence of race and cultivar specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of

Cladosporium fulvum and tomato Physiol. Plant Pathol. 21: 1-11.

De Wit, P.J., Toma, I.M.J. y Joosten, M.H.A. (1988). Race-specific elicitors and pathogenicity factors in the Cladosporium fulvum-tomato interaction. En Physiology and Biochemistry of Plant-Microbial Interaction. Editado por Keen, T., Kosuge, T. y Walling, L.L., pp. 111-119, Rockville, Maryland, U.S.A.

Dixon (1986). The phytoalexin response: elicitation, signalling and the control of host gene expression. Biol.Rev. 61, 239-291.

Ealing, P.M., Chakravorty, A.K. y Scott, K.J. (1984). Powdery mildew infection alters in vitro transcription patterns in wheat leaf nuclei. Plant Cell Physiol. 25, 739-747.

Ealing, P.M., Chakravorty, A.K. y Scott, K.J. (1985). Transcriptional changes in wheat leaf nuclei during the early and intermediate stages of rust infection. Plant Cell Physiol. 26, 1597-1605.

Ealing, P.M., Chakravorty, A.K. y Scott, K.J. (1986). Changes in the expression of host genes located in specific restriction endonuclease fragments of wheat DNA during rust infection. Plant Cell Physiol. 27, 581-589.

Ellingboe, A.H. (1976). Genetics of host-parasite interactions. En: Physiol. Plant Pathol. pp. 761-788. Editado por R. Heitfus y P.H. Williams. Springer, Berlin.

Ellingboe, A.H. (1984). Genetics of host-parasite relations: an essay. Adv. Plant Pathol. 2, 131-151.

Ellingboe A.H.(1978). Genetic analysis of host-parasite interactions. En: The Powdery Mildews. Ed. por D.M. Spencer. Academic Press. New York. U.S.A. pp: 159-181.

Favret, E.A. (1965). Induced mutations in breeding for disease resistance. En Reports Meet. FAO/IAEA: The Use of Induced Mutations in Plant Breeding, pp. 521-526, Pergamon Press, London.

Favret, E.A. (1969). The genetic bases of plant resistance to pathogens. Ciencia e Cultura. 19, 170-187.

Favret, E.A., Solari, R., Manghens, A., Avila, A. (1969). Genetic control of the quantitative and qualitative

production of endosperms proteins in wheat and barley New Approaches to breeding for improved plant protein. International Atomic Energy Agency pp. 87-107.

Favret, E.A. (1971). The host-pathogen system and its genetic relationships. Barley Genetics II, Proc. 2nd Intern. Barley Genet. Symp., pp. 457-471, Pullman, Washington, U.S.A.

Favret, E.A., Cenoz, H.P., Silvero Sanz, S.I., Solari, R.M. y Mujica, F.L. (1969). Efecto de posición inducido en trigo para reacción a las royas. En Induced Mutations in Plants, pp. 123-133, Symp. IAEA/FAO, Pullman, Washington, U.S.A.

Flor, H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of Melampsora lini. Phytopathology 32,5.

Flor, H.H. (1955). Host-parasite interactions in flax rust, its genetics and another implications. Phytopathology 45, 680-685.

Flor, H.H. (1960). The inheritance of X-ray induced mutations to virulence in a urediospore culture of race 1 of Melempsora lini Phytopathology 72, 1020-1028.

Franzone, P.M. y Favret, E.A. (1982). Mutations for pathogenicity in wheat leaf rust Puccinia recondita var. tritici induced by ethyl-methane sulphonate. Phytopath. Z. 104, 289-298.

Fraser, R.S.S. (1988). Resistance to plant virus. Oxford Surveys of Plant Mol. Cell Biol. 5, 1-45

Fritig, B., Kauffmann, S., Dumas, B., Geoffroy, F., Kopp, M. y Legrand, M. (1987). Mechanism of the hipersensitivity reaction of plants. En: Plant resistance to viruses. Editado por Wiley y Chichester (IBA Found. Symop.) pp. 92-108.

Fristensky, B., Riggleman, R.C., Wagoner, W. y Hadwiger L.A. (1985). Gene expression in susceptible and disease resistant interactions of peas induced with Fusarium solani pathogens and chitosan. Physiol. Plant Pathol. 27, 15-23.

Galili, G. y Feldman M. (1983). Genetic control of endosperm proteins in wheat. Theor. Appl. Genet. 66: 77-86.

Gianinazzi, S., Martin, C. y Vallee, J.C. (1970). Hipersensibilité aux virus, température et protéines solubles

chez le Nicotiana Xanthi nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. CR Hebd Séances Acad.Sci.Ser. D. Sci Nat. 270, 2383-2386.

Graham, T.L. y Graham, M.Y. (1991). Cellular coordination of molecular responses in plant defense. Mol. Plant-Microbe Interactions. 4, 415-422.

Hahlbrook, K., Lamb, c. J., Purwin, C., Ebel, J., Fauts, E. y Schäfer, E. (1981). Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from Phytophthora megasperma var. sojae Induction of the enzymes of general phenylpropanoid metabolism. Plant Physiology 67, 768-773.

Harber, N.P., Bartels, D.Y. y Thompson R.D. (1985). Analysis of the gliadin multigene loci in bread wheat using nullisomic tetrasomic lines. Mol. Gen. Genet. 198: 234-242.

Heath, M.C. (1976). Hipersensitivity, the cause or the consequence of rust resistance? Phytopathology 66, 935-936.

Heath, M.C. (1981a) Resistance of plants to rust infection. Phytopathology 71, 971-974.

Heath, M.C. (1981b). A generalize concept of host-parasite specificity. Phytopathology 71, 1121-1123.

Heath, M.C. (1991). The role of gen-for-gen interactions in the determination of host species specificity. Phytopathology. 81: 127-130.

Hedrick, S., Bell, J.N., Boller, T. y Lamb, C.J. (1988). Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. Plant Physiol. 86, 182-186.

Heinz, R.A. y Hopp, H.E. (1986). Molecular changes in wheat infected with Puccinia recondita tritici. En Actas del Primer Congreso Nacional de Trigo. IV, pp. 77-81, Pergamino, Argentina.

Heinz, R.A., Hopp, H.E. y Favret, E.A. (1990). Proteins associated with specific host-pathogen relationships in infections with wheat rust. Plant Cell Physiol. 31, 1221-1227

Heinz, R.A., Del Vas, M., Moratinos, L., Favret, E.A. y Hopp, H.E. (1991). Differential accumulation of trnslatable mRNA species during a specific host-pathogen interaction between Puccinia recondita tritici and Triticum aestivum.

Enviado a Phisiol. Mol. Plant Pathol.

Hoppe, H.H., Hümme, B. y Heitefuss, R. (1980). Elicitor induced accumulation of phytoalexines in healthy and rust infected leaves of Phaseolus vulgaris. Phytopathol. Z 97, 85-88.

Jensen, J., Jorgensen, J.H., Jensen H.P., Giese, H. y Doll, H.(1980). Linkage of the hordein loci Hor 1 y hord 2 with the powdery mildew resistance loci Ml-k and Ml-a on barley chromosome 5. Theor. Appl. Genet. 58: 27-31-

Johnson (1934). A tropic response in germ tubes of urediospores of Puccinia graminis tritici. Phytopathology 24, 80-82.

Jones, D.R. y Deverall, B.J. (1977 a). The effect of the Lr 20 resistance gene in wheat on the development of leaf rust. Puccinia recondita. Physiol. Plant Pathol. 10, 275-284.

Jones, D.R. y Deverall, B.J. (1977 b). Experimental manipulation of the hypersensitive response associated with the expression of the Lr 20 gene in wheat following infections by rust, Puccinia recondita tritici. Physiol Plant Pathol. 10, 275-284.

Jones, D.R. y Deverall, B.J. (1978). The use of leaf transplants to study the course of hypersensitivity to leaf rust Puccinia recondita, in wheat carryng the Lr 20 gene. Physiol. Plant Pathol. 12: 311- 329.

Katsuya, K., Kakishima, M. y Sato, S. (1978). Axenic culture of two rust fungi, Puccinia coronata f. pp. avenae and Puccinia recondita f. sp. tritici . Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 44, 606-611.

Keen, N.T., y Yoshikawa, M. (1983). β -1,3-endonuclease from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. Plant Physiol. 71, 460-465.

Keen, N.T., Tamaki,S., Kobashi, D., Gerhold, D., Stayton, M., Shen, H., Gold, S, Lorang, J., Thordal, l., Christensen, h., Dahlbeck, D. y Staskawicz, B. (1990). Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. Mol. Plant-Microbe Interaction 3: 112-121.

Kiyosawa, S. y Kazunari N. (1988). Disease resistance in crop plants and mutation breeding. En: Evaluation and availability of the mutations for disease resistance. Gamma Field Symposia. Japón. pp. 1-32.

Kobayashi, D.Y., Tamaki, S.L. y Keen, N.T. (1990). Molecular characterization of avirulence gene D from Pseudomonas syringae pv. tomato. Mol. Plant-Microbe Interactions. 3: 94-102.

Köller, C.R., Allan, C.R. y Kolattukudy, P.E. (1982). Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of Pisum sativum by Fusarium solani f.sp. pisi. Physiol. Plant Pathol. 20 47-60.

Kombrink, E., Schröder, M. y Hahlbrock, K. (1988). Several "pathogenesis-related" proteins are 1,3- β -glucanases and chitinases. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 782-786.

Kuhn, D.N., Chappell, J., Boudet, A. y Hahlbrock, K. (1984). Induction of fenilalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:Co A ligase mRNAs in culture plant cells by UV light or fungal elicitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1102-1106.

Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. y Dixon, A. (1989) Signals and transduction Mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell 27, 215-224.

Lawton, M.A., y Lamb, C.J. (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitors, wounding and infection. Mol.Cell.Biol. 7, 335-341.

Lawton, M.A., Kragh, K., Jenkins, S.M., Dron, M. Clouse, S.D., Dixon, R.A. y Lamb, C.J. (1988). Nuclear protein acting silencer in a defense gene promoter. J. Cell. Biol. Suppl. 12c, 222.

Linthorst, H.J. (1991). Pathogenesis related proteins of plants. Critical Reviews in Plant Sciences. 10: 123-150.

Loegering, W.Q. (1966). The relationships between host and pathogen in stem rust of wheat. Proc. 2nd. Wheat Genetic Symp. Lund1963. Hereditas Suppl. 2, 167-177.

Loegering, W.Q. y Sears, C.R. (1981). Genetic control of disease expression in stem rust of wheat. Phytopathology 71

425-428.

Mains E.B. y Jackson, H.S. (1926). Physiologic specialization in the leaf rust of wheat, Puccinia triticina Erikss. *Phytopathology* 16, 89-120.

Maiti, I.B. y Kolattukudy, P.E. (1979). Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science* (Washington D.C.) 205, 507-508.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.

Manners, J.M. y Scott, K.J. (1985). Reduced translatable messenger RNA activities in leaves of barley infected with Erysiphe graminis f. sp. hordei. *Physiol. Plant Pathol.* 26, 297-308.

Manners, J.M., Davidson, A. D. y Scott, K.J. (1985). Patterns of post-infectional protein synthesis in barley carrying different genes for resistance to the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 4, 275-283.

Mauch A. J., Hadwiger L. A. y Boller T. (1989). Ethylene symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol.* 76, 607-611

Mauch F. y Staehelin, A. (1989). Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *The Plant Cell.* 1, 447-457.

Mayama S., Tani, T., Matsuura, Y., Ueno, T. y Fukami, H. (1981). The production of phytoalexins by oat in response to crown rust, Puccinia coronata f. sp. avenae. *Physiol. Plant Pathol.* 19 217-226.

Mayama, S., Matsuura, Y., Iida, H. y Tani, T. (1982). The role of avenalumin in the resistance of oat to crown rust, Puccinia coronata f. sp. avenae. *Physiol. Plant Pathol.* 20, 189-199.

Mosseman J.G. (1966) Genetics of powdery mildew. *Ann Rev. Phytopathol.* 4, 269-290.

Mujica, F.L., Antonelli, E.F. y Cenoz, H.P. (1972). Reacción frente a Puccinia recondita tritici de las líneas del

cruzamiento entre la variedad de trigo Sinvalocho M.A. y su mutante inducida. En *Induced Mutations and Plant Improvement*, pp. 355-364, IAEA, Vienna, Austria.

Myhill, R.R. y Konzak, C.F. (1967). A new technique for culturing and measuring barley seedlings. *Crop Sci.* 7, 275-276.

Okita T., Cheesbrough V. y Reeves, C. (1985). Evolution and heterogenicity of the α/β type gliadins DNA sequences. *Jour. Biol. Chem.*

Ouchi, S., Oku H., Hibino, C. y Akiyama, I. (1974). Induction of accessibility to a nonpathogen by preliminary inoculation with a pathogen. *Phytopath. Z.* 79, 142-154.

Ouchi, S., Oku, H. y Hibino, C. (1976). Localization of induced resistance and susceptibility in barley leaves inoculated with the powdery mildew fungus. *Phytopathology* 66, 901-905.

Payne, R. (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 141-153.

Pure, G.A., Chakravorty, A.K. y Scott, K.J. (1979). Cell-free translation of polysomal messenger RNA isolated from healthy and rust-infected wheat leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 15, 201-209.

Rebamann, G., Hertig, C., Bull, J., Mauch, F. y Dudler, R. (1991). Cloning and sequencing of cDNA encoding a pathogen induced putative peroxidase of wheat (*Triticum aestivum*, L.). *Plant Molecular Biology* 16: 329-331.

Roby, D. y Esquerre-Tugaye, M.T. (1987). Induction of chitinases and translatable mRNA for these enzymes in melon plants infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Plant Science* 52, 175-185.

Roby, D., Toppan, A. y Esquarré-Tugayé, M.T. (1986). Cell surfaces in plant-microorganism interactions. VI. Elicitors of ethilene from *Colletotrichum lagenarium* trigger chitinase activity in melon plants. *Plant Physiol.* 81, 228-233.

Rohringer, R., Kim, W.K. y Samborski, D.J. (1979). A histological study of interactions between avirulent races of stem rust and wheat containing resistance gene Sr5, Sr6, Sr8,

Sr22. Can. J. Bot. 57, 324-331.

Ryan, C.A., Bishop, P., Walker-Simmons, M., Brown, W.E. y Graham, J.S. (1985). Pectic fragments regulate the expression of proteinase inhibitor genes in plants. En: Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. Ed. por J.L.Key y T. Kosuge. pp. 319-334.

Samborsky, D.J. (1985). Wheat leaf rust. En: The Cereal Rust. Vol. II. Editado por A.P. Roelfs y W.R. Bushnell. pp. 39-59.

Samborsky, D., Kim, W.K., Rohringer, R, Howes, N.K y Baker R.J. (1977). Histological studies on host-cell necrosis conditioned by the Sr6 gene for resistance in wheat to stem rust. Can. J. Bot. 55, 1445-1452.

Sanderson, J.L., Bruenning, G., Russell, M.L. (1985). Possible molecular basis of immunity of cowpeas to cowpea mosaic virus. En: Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. UCLA Symposia on Molecular and Cell. Biology. New Series 22. Editado por J.L. Key y T. Kosuge, New York pp. 401-412.

Schafer, J.F.; Roelfs A.P. y Bushnell, W.R. (1984). Contributions of early scientists to knowledge of cereal rust. En: The Cereal Rusts. Vol. 1., Ed. por W.R. Bushnell y A.P. Roelfs. Academic Press, INC.

Schweizer, P., Hunziker, W. y Mösinger, E. (1989). cDNA cloning, in vitro transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (Triticum aestivum L.) with induced resistance to Erysiphe graminis f. sp. tritici. Plant Mol. Biol. 12, 643-654.

Sequeira L. (1983). Mechanisms of induced resistance in plants. Annual Review of Microbiology 37, 51-79.

Schmidt, W.E. y Ebel, J. (1987). Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean Glycine max. Proc,Natl.Acad.Sci. USA 84, 4117-4121.

Shaw, M.(1963). The physiology and host-parasite relations of the rusts. Annu. Rev. Phytopatol. 1, 259-294.

Sharp, J.K., Albersheim, P., Ossowski, P., Pilotti, A., Garegg, P. y Lindberg, P. (1984). Comparison of the structures

and elicitors activities of a synthetic and a mycelial-wall-derived hexa-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitol isolated from the mycelial walls of Phytophthora megasperma f.sp. glycinea. J.Biol.Chem. 259, 11341-11345.

Shaw (1963). The physiology and host-parasite relations of the rusts. Ann. Rev. Phytopathol. 1, 259-294.

Shaykh, M., Soliday, C. y Kolattukudy, P.E. (1977). Proof for the production of cutinase by Fusarium solani f. sp. pisi during penetration into its host, Pisum sativum. Plant Physiol. 60, 170-172.

Simpson, R.S., Chakravorty, A.K. y Scott, K.J. (1979). Selective hydrolysis of barley leaf polysomal messenger RNA during the early stages of powdery mildew infection. Physiol. Plant Pathol. 14, 245-258.

Solari, R.M. y Favret, E.A. (1968). Genetic control of protein constitution in wheat endosperm and its implication on induced mutagenesis. Mutations in Plant Breeding II. International atomic energy agency. pp. 219-231.

Soliday, C.L., Flurkey, W.H., Okita, T.W. y Kolattukudy, P.E. (1984). Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, an enzyme involved in fungal penetration of plants. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 81, 3939-3943.

Staples R.C. y Macko V. (1984). Germination of urediospores and Differentiation of infection structures. En: The Cereal Rust. Vol. 1, Editado por W.R. Bushnell y A.P. Roelfs. Academic Press, INC.

Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D. y Keen, N.T. (1984). Cloned avirulence gene of Pseudomonas syringae pv. glycinea determines race-specific incompatibility on Glycine max (L) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6024-6028.

Suárez, E.Y. y Favret, E.A. (1984). Reaction to leaf rust of a "Sinvalocho" wheat gene in hemizygous condition. Z. Pflanzenzüchtung 92, 289-294.

Sutton, B.C.S., y Shaw, M. (1982). Changes in two ribonuclease isozymes during rust infection of flax cotolidones. Plant Physiol. 69: 205-209.

Tani, T. y Yamamoto, H. (1979). RNA and protein synthesis

and enzyme changes during infection. En: Recognition and specificity in Plant Host-Pathogen Interaction. Editado por J.M. Daly y I. Uritani pp 273-287. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.

Tani, T., Yamamoto, H., Onoe, T. y Naito, N. (1975). Initiation of resistance and host cell collapse in the hypersensitive reaction of oat leaves against Puccinia coronata avenae. Physiol. Plant Pathol. 7, 231-242.

Taylor, B. y Powel, A. (1982). Isolation of plant DNA and RNA. Focus 4, 3: 4-6.

Tepper, C.S. y Anderson, A.J. (1986). Two cultivars of bean display a differential response to extracellular components from Colletotrichum lindemuthianum. Physiol. Mol.Plant.Pathol 29, 411-420.

Thompson R.D., Bartels, D. Harberd, N.P. y Flavell, R.B. (1983). Characterization of the multigene family coding for HMW glutelin subunits in wheat using cDNA clones. Theor. Appl. Genet. 67:87-96.

VanEtten, H.D, Matthews, D.E. y Matthews, P.S. (1989). Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 143-164.

Vanderplank, J.E. (1984). Disease Resistance in Plants. Academic Press, Orlando, Florida, 194 pp.

Van Loon, L.C. (1982). Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defence against virus infection. NATO Adv. Study Inst. Ser., Ser. A 37, 247-273.

Van Loon, L.C. y Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. "Samsun" and "Samsun NN". Virology 40, 199-211.

Von Broembsen, S.L. y Hadwiger, L.A. (1972). Characterization of disease-resistant responses in certain gene-for-gene interactions between flax and Melampsora lini. Physiol. Plant Pathol. 2, 207-215.

Vögeli, U., Meins, F. y Boller, T. (1988). Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. Planta 174, 364-372.

Wahl, I., Anikster Y., Manisterski, J. y Segal A. (1984).

Evolution at the Center of Origin. En: The Cereal Rust. Vol. 1. Editado por W.R. Bushnell y A.P. Roelfs. Academic Press, INC.

Ward, E. W.B. y Stoessl, A. (1976). On the question of "elicitors" or "inducers" in incompatible interactions between plants and fungal pathogens. *Phytopathology* 66, 940-941.

White, R.F., Rybicki, E.P., Von Wechmar, M.B., Dekker, J.L. and Antoniw, J.F. (1987). Detection of PR 1-type proteins in Amaranthaceae Graminae and Solanaceae by immunoelectroblotting. *J. Gen. Virol.* 68, 2043-2048.

Williams, P.E, Scott, K.J. y Kuhl, J.L. (1966). Vegetative growth of Puccinia graminis f. sp. tritici in vitro. *Phytopathology* 56, 1418-1419.

Woloshuk, C.P. y Kolattukudy P.E. (1986). Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of Fusarium solani f.sp. pisi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1704-1708.

Wynn, W.K. y Staples, R.C. (1981). Tropisms of fungi in host recognition. En: Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility. Editado por R.C. Staples y G.A. Toenniessen. pp. 45-49. Wiley, New York.

Yamamoto, H. y Tani, T. (1982). Two-dimensional analysis of enhanced synthesis of proteins in oat leaves responding to the crown rust infection. *Physiol. Plant Pathol.* 21, 209-216.

Young, D.H. y Pegg, G.F. (1982). The action of tomato and Verticillium albo-atrum glycosidases on the hyphall wall of V. albo-atrum. *Physiol. Plant Pathol.* 21, 411-423.

Ziegler, E. y Pontzer, R. (1982). Specific inhibition of glucan-elicited glyceollin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glyceollin of Phytophthora megasperma f. sp. glycinea *Physiol. Plant Pathol.* 20, 321-331.

Polipéptidos relacionados con la interacción
hospedante-patógeno en el sistema trigo-roya de la hoja

Un problema central de la fitopatología es esclarecer los mecanismos de defensa a las enfermedades. Se reconoció la presencia de genes específicos que interactúan determinando el tipo de interacción. Los mecanismos moleculares que determinan si una interacción es compatible o incompatible no han sido aún suficientemente dilucidados. Se postula que los mRNAs y proteínas específicos codificados por estos genes, se inducirían en una etapa temprana en el reconocimiento de ambos organismos.

El sistema trigo-roya de la hoja fue elegido como modelo para el estudio de relaciones hospedante-patógeno altamente específicas. Se utilizaron dos líneas isogénicas de trigo (Triticum aestivum) y tres clones genéticamente relacionados del patógeno (Puccinia recondita tritici). Este material con fondo genético común permite la identificación de polipéptidos y de mRNAs específicos inducidos a causa de la infección con el patógeno.

En primer lugar se caracterizaron los cambios polipeptídicos inducidos a lo largo del proceso de infección a través del marcado "in vivo" con ³⁵S-Metionina de proteínas sintetizadas "de novo". En segundo lugar se caracterizaron los mRNAs inducidos en las distintas interacciones hospedante-patógeno a través de la síntesis "in vitro" de polipéptidos en un sistema libre de células. Se analizaron los patrones electroforéticos de estos polipéptidos en geles desnaturizantes de poliacrilamida y posterior fluorografía. Curvas de tiempo mostraron que los primeros cambios polipeptídicos tanto "in vivo" como "in vitro" se detectaron hacia el tercer día del proceso de infección. La comparación de seis interacciones caracterizadas y sus respectivos controles sin inocular permitió asignar la inducción o disminución de



determinadas bandas polipeptídicas a interacciones entre genes/alelos del hospedante y genes del patógeno. En este contexto se detectó:

a) inducción específica tanto a nivel de RNA como de proteínas en interacciones compatibles (bandas de 85, 15 y 24 kDa) e incompatibles (bandas de 39 y 21,5 kDa).

b) disminución específica de polipéptidos "in vivo" (52 y 37 kDa) e "in vitro" (34 kDa).

c) dos mRNAs (20,5 y 32,5 kDa) inducidos específicamente en las interacciones que involucran a la raza FO₁ independientemente del hospedante.

Se concluye la existencia de asociaciones entre mRNAs y proteínas inducidas con interacciones compatibles como incompatibles por lo que el reconocimiento específico para el sistema trigo-roya de la hoja podría estar determinado por unas u otras (o ambas) según los genes interactuantes. Se aislaron clones de cDNA diferenciales correspondientes a RNA mensajeros inducidos en el sistema compatible Gamma 1R-FO₁ hacia el día 5 del proceso de infección que codificarían para polipéptidos específicos de interacción o específicos de raza. Estos clones podrán ser utilizados para llegar a aislar los genes que intervienen en el reconocimiento de hospedante y patógeno. Simultáneamente se identificó un marcador génico correspondiente a una secuencia codificante de una proteína de reserva (gliadina) que está ligada a alguno de los genes de reacción a roya de la hoja y que podría utilizarse como vía alternativa para aislar los genes de interés.