

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE *Hemileia vastatrix* - *Coffea* spp.: PROTEÍNAS TEMPRANAS

Liliana María Hoyos-Carvajal[†]; Luis Fernando Gil-Vallejo^{**}; Arumbio Valencia^{***}

RESUMEN

HOYOS C., L.M.; GIL V., L.F.; VALENCIA A. Estudio de las interacciones de *Hemileia vastatrix*-*Coffea* spp.: proteínas tempranas. Cenicafé 54(4):278-285. 2003

Mediante una combinación de SDS-PAGE y Western-blot, fue posible detectar variaciones proteínicas ocurridas a las 8 y 12 horas de iniciado el proceso de patogénesis, tanto en interacciones de compatibilidad como en interacciones de incompatibilidad entre la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y la planta de café (*Coffea* spp). En ambas interacciones se detectaron bandas con pesos moleculares entre 30 y 39 kDa, que no estaban presentes en el testigo sano. Cuando se compararon los perfiles proteínicos en interacciones de susceptibilidad y resistencia, se logró detectar la presencia de bandas de bajo peso molecular propias de la interacción de resistencia. Estas bandas de proteína no aparecen en los perfiles electroforéticos del lavado de líquidos intercelulares (LLI). Los análisis de Western-blot realizados con proteínas extraídas de uredosporas de la raza II de roya, confirman que la proteína específica en las interacciones de resistencia no está relacionada con el patógeno. Lo anterior permite concluir que en los genotipos evaluados se presentan algunos fenómenos específicos para resistencia, donde los determinantes de virulencia del patógeno en una relación de incompatibilidad actúan como señales de avirulencia a caracteres de resistencia en la planta.

Palabras claves: Café, *Hemileia vastatrix*, susceptibilidad, resistencia, proteínas.

ABSTRACT

By using a combination of SDS-PAGE and Western-blot, it was possible to detect protein variations between 8 and 12 hours after the pathogenic process had begun, not only in compatibility interactions but also in incompatibility interactions of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) and the coffee plant (*Coffea* spp). In both interactions bands with molecular weights between 30 and 39 kDa were detected. These bands were not present in the healthy control. When the proteins profiles in susceptibility and resistance interactions were compared, it was possible to detect the presence of low molecular weight proteins which were characteristic of the resistance interaction. These protein bands were not detected in the electrophoretic profiles of intercellular liquid washing (ILW). The Western-blot analyses done by using protein extracts from uredospores of the rust race II, confirmed that the specific protein in the resistant interactions are not related with the pathogen. These results permit to conclude that in the genotypes tested some specific resistance phenomena, in which pathogen's virulence determinants in an incompatibility relation act as avirulence signals against resistance characters in the plant are present.

Keywords: Coffee, *Hemileia vastatrix*, susceptibility, resistance, proteins.

^{*} Ing. Agrónoma M.Sc. Investigadora Asistente. C.I.B. Medellín, Colombia.

^{**} Asistente de Investigación. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia

^{***} Profesor Asociado. Departamento de Química. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

La resistencia de las plantas al ataque de patógenos ocurre a los niveles de cultivares o de especies, y se cree que estas interacciones son mediadas por el reconocimiento raza-específico ó raza-no específico (20). La planta de café emplea su metabolismo primario y secundario para responder a estos tipos de estrés. En la Figura 1, se aprecian algunos de estos mecanismos. Para interacciones de resistencia y susceptibilidad a roya de cafeto la planta genera respuestas bioquímicas semejantes a otros casos de defensa pero los sistemas de reconocimiento que actúan en cada caso son diferentes en complejidad y modo de acción, de tal manera que para un mismo agente causante de una enfermedad, como lo es la roya, la planta responde de manera diferente. Tales respuestas dependen de la interacción de los genotipos de la planta y el patógeno y se denominan como relación gen por gen. Este concepto desarrollado por Flor en 1965 (8), es de gran valor en la genética clásica para explicar la especificidad de los hongos fitopatógenos.

Sin embargo, las bases moleculares de las interacciones entre la roya del cafeto *Hemileia vastatrix*, y la planta de café, *Coffea spp.* son aún desconocidas, pero sí muy bien registradas (15, 16, 20, 23). Concretamente en café se han realizado diversos estudios relacionados con los productos de genes relacionados con los mecanismos de defensa de la planta como: enzimas líticas y fitoalexinas, o con resistencia sistémica adquirida (RSA); así como también sobre mecanismos oxidativos, metabolismo de fenoles y producción de especies reactivas de oxígeno (1, 2, 3, 6, 10, 11, 12, 18, 21, 22, 25, 26). Estas investigaciones han demostrado que 48 horas después de la inoculación no existen diferencias evidentes en los patrones de proteínas en interacciones de susceptibilidad y resistencia.

Otros estudios llevados a cabo con café, han mostrado diferencias a nivel cuantitativo

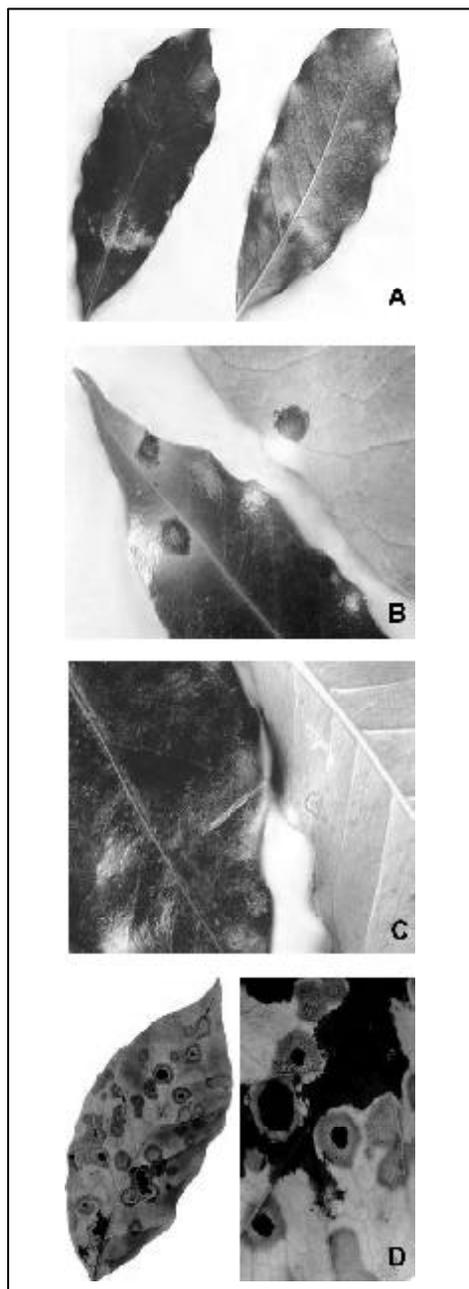


Figura 1. Respuestas de la planta de café ante estrés causado por factores bióticos y abióticos. **A)** Respuesta generada por golpe de sol. **B)** respuesta hipersensitiva. **C)** Reacción de resistencia a roya. **D)** Islas verdes: respuesta de compatibilidad a roya.

y cualitativo en los patrones de proteínas durante las primeras 24 horas de iniciado el proceso de patogénesis, con cambios significativos en el tejido de *Coffea* spp. a partir de las primeras 6 horas, señalando la ocurrencia de eventos metabólicos iniciales, entre los cuales puede estar el reconocimiento raza-específico. Basados en estos antecedentes se planteó esta investigación con el objetivo de estudiar las variaciones en los patrones de proteínas de las interacciones entre *H. vastatrix* vs *Coffea* spp, durante las primeras 12 horas de iniciado el proceso de patogénesis, y con el fin de tratar de elucidar los determinantes de susceptibilidad y resistencia del cafeto a diferentes razas de roya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biología y en almacigos del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas-Colombia, ubicado a una longitud 05°00' N, latitud 75° 36', altitud de 1.310m, precipitación anual de 2.500mm, con una temperatura media de 20,5°C, humedad relativa del 77% y brillo solar de 1.842 horas/año, y en los campos experimentales de la Estación Central Naranjal de Cenicafé, Chinchiná, Caldas-Colombia, ubicada a una longitud 04°59' N, latitud 75° 39' O, altitud de 1.400m, precipitación anual de 2.259mm, con una temperatura media de 21,6°C, humedad relativa del 75% y brillo solar de 1.819 horas/año (7).

Material Biológico. Se utilizaron hojas jóvenes y sanas del segundo par, completamente desarrolladas y provenientes tanto de plántulas de 4 meses de edad, como de plantas adultas de los grupos fisiológicos de resistencia a roya R (SH6) y E (SH5). De *H. vastatrix* se emplearon uredinosporas de las razas II (V5) y XXII (V5-6) previamente identificadas (5, 9).

Extracción de proteínas. Se pulverizaron muestras de hojas de 8 y 12 horas de haber sido inoculadas con uredinosporas de roya de café en un mortero con nitrógeno líquido y posteriormente se homogeneizaron con dos volúmenes de una solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7,4 que contenía 1mM de EDTA, 1mM de DTT, 50mM de Na₂S₂O₅, 0,1% de DTT y 0,1% de PVPP. El material homogeneizado se centrifugó a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se dializó contra agua y se liofilizó. El polvo resultante se utilizó como fuente de proteínas para las pruebas de electroforesis y de Western Blot.

Lavado de líquidos Intercelulares (LLI). La obtención de los líquidos intercelulares se logró mediante una modificación de las metodologías propuestas por Klement (17), y Vinasco (27).

El proceso se inició con la introducción del material vegetal en una canastilla de vidrio dentro de una cámara de Wit, de forma que la solución de extracción cubriera completamente la superficie de los tejidos. A continuación se activó el sistema de vacío durante 15 minutos a una presión absoluta de 10mm Hg para facilitar el desalojo de los gases intercelulares. Posteriormente, el sistema se dejó a presión atmosférica de 15 a 20 minutos permitiendo así que la solución amortiguadora llenara el espacio que era ocupado por los gases. Para extraer los líquidos intercelulares se adecuaron tubos Beckman con un soporte de acrílico para sostener la hoja e impedir que esta cayera al fondo del tubo donde estaban los líquidos intercelulares. Una vez éstos se recogieron, se centrifugaron a 5.000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Determinación de proteínas. El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford (4).

Separación de proteínas por electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo sobre geles en gradiente 10-15% y 8-25%; los cuales fueron corridos en un equipo PhastSystem siguiendo las instrucciones del fabricante. La tinción se efectuó con coomassie blue G-250, y posteriormente los geles se procesaron con un analizador de imágenes Image Master VDS, software versión 3.0.

Western Blot. Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Timmons y Dunbar (24), haciendo uso de anticuerpos de tipo policlonal contra uredinosporas de roya raza II, suministrados por la disciplina de fitopatología de Cenicafé.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas llevadas a cabo mostraron diferencias entre los perfiles proteínicos de café sano e inoculado con roya. En los diferentes tiempos evaluados para las interacciones de resistencia y susceptibilidad (RII y RXXII), se detectaron bandas con pesos moleculares entre 30 y 39Kda que no están presentes en el testigo sano, y las cuales aparecen con mayor intensidad en interacciones de resistencia. Igualmente, se presentó mayor intensidad en productos de bajo peso molecular para las interacciones de resistencia y se evidenciaron cambios en la intensidad de proteínas constitutivas (Figura 2). Resultados similares fueron registrados por Münch (19), en investigaciones sobre las relaciones *Triticum aestivum* y *P. graminis tritici*. De igual forma, Guzzo y Martins (12), detectaron proteínas con actividad hidrolítica y con rangos de peso molecular similar presentes en interacciones café/roya, inespecíficas para resistencia o susceptibilidad

Cuando se compararon los perfiles proteínicos de interacciones de susceptibili-

dad y resistencia en geles en gradiente del 10-15% (Figura 3), se denotó la presencia de bandas de bajo peso molecular específicas a resistencia. En geles en gradiente del 8 - 25% se evidenció una banda de peso menor a los 14KDa, específica de esta interacción. Las otras bandas con menor intensidad, tienen su homólogo tanto en interacciones de

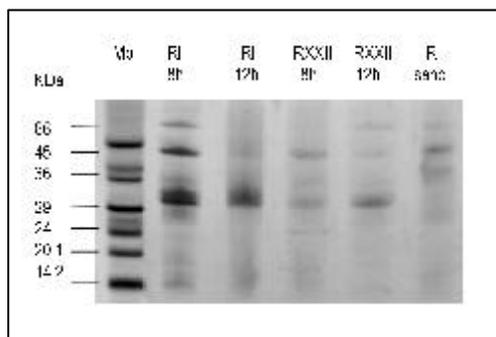


Figura 2. SDS-PAGE de proteínas totales en gradiente 10-15% de interacciones compatibles e incompatibles de roya (*Hemileia vastatrix*) y café (*Coffea* sp).

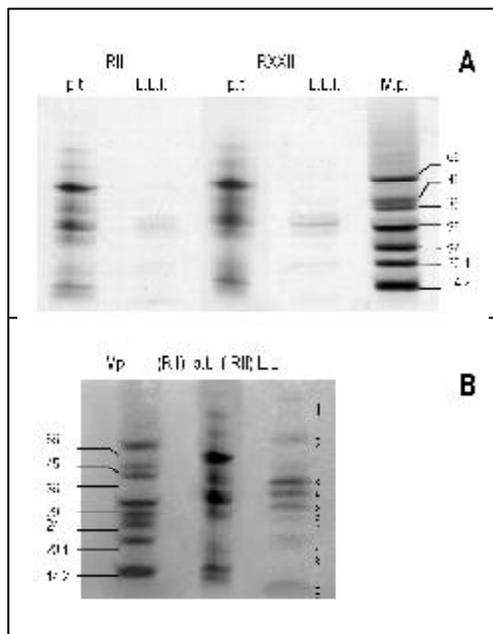


Figura 3. SDS-PAGE de proteínas totales en interacciones compatibles e incompatibles de roya (*Hemileia vastatrix*) y café (*Coffea* sp). A) Gel en gradiente 10-15%. B) gel en gradiente 8-25%.

susceptibilidad como de resistencia. Esta banda específica se encuentra en muy bajas concentraciones y aparece expresada con mayor intensidad entre las 9 y 12 horas de iniciado el proceso. Es posible que la proteína encontrada en la interacción de café grupo fisiológico de resistencia R (SH_6) y roya raza II (V_3), esté relacionada con la expresión del gen SH6 de la planta el cual la hace resistente al gen V_3 del hongo. Los resultados obtenidos en esta interacción roya/hospedante, son coincidentes con lo registrado por Hanson (13), quien manifiesta que en interacciones de resistencia de maíz a *Puccinia polysora* se elicitaba una proteína a las 17 horas, la cual no se correlaciona con productos de mecanismos de defensa conocidos en plantas.

Con el fin de determinar si las proteínas detectadas como específicas para la interacción de resistencia se encuentran en la matriz extracelular, se realizaron electroforesis del 10-15% (Figura 4).

En los carriles de L.L.I del gel A en gradiente del 10-15%, se observaron 4 bandas de proteína. Este análisis no permitió conocer más acerca de la composición proteínica de los L.L.I, por lo cual se hizo necesario concentrar la muestra y efectuar de nuevo el análisis, el cual se muestra en el gel B. Se hallaron proteínas en los espacios intercelulares con pesos moleculares de: 88,5; 53; 40,5; 34; 29; 27; 22; 21 y 13Kda. Las bandas de proteínas predominantes, es decir, las correspondientes a 40,5; 34 y 29 están en el rango de peso de aquellas encontradas en procesos de patogénesis y no específicas de las interacciones. Por su baja concentración en perfiles de proteínas totales no es posible determinar su ubicación dentro o fuera de la célula. La proteína de bajo peso molecular, específica de interacciones de resistencia, no aparece en los perfiles de L.L.I. aunque si aparecen otras proteínas con pesos cercanos a los 13KDa, las cuales no son específicas

de resistencia, tal y como se demuestra en el análisis densitométrico de proteínas de ambas interacciones (Figura 5). No se observan diferencias en los patrones de proteínas de interacciones compatibles e incompatibles.

Debido a que en el patosistema están interactuando la roya y el café, es posible que

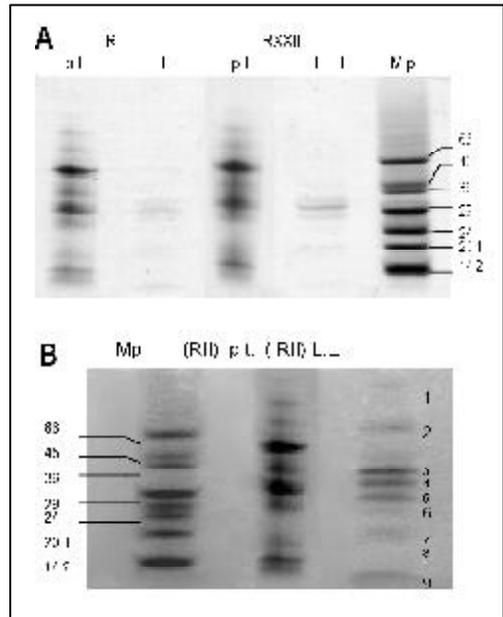


Figura 4. SDS-PAGE de proteínas totales (p.t) y lavado de líquidos intercelulares (L.L.I) en interacciones compatibles e incompatibles de roya (*Hemileia vastatrix*) y café (*Coffea* sp). A. Muestras sin concentrar. B. Muestra concentrada.

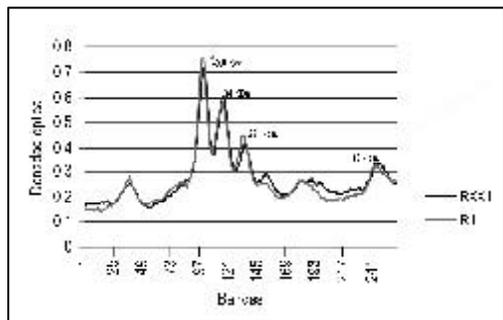


Figura 5. Análisis densitométrico del barrido electroforético de proteínas provenientes del L.L.I en interacciones compatibles e incompatibles de roya (*Hemileia vastatrix*) y café (*Coffea* sp).

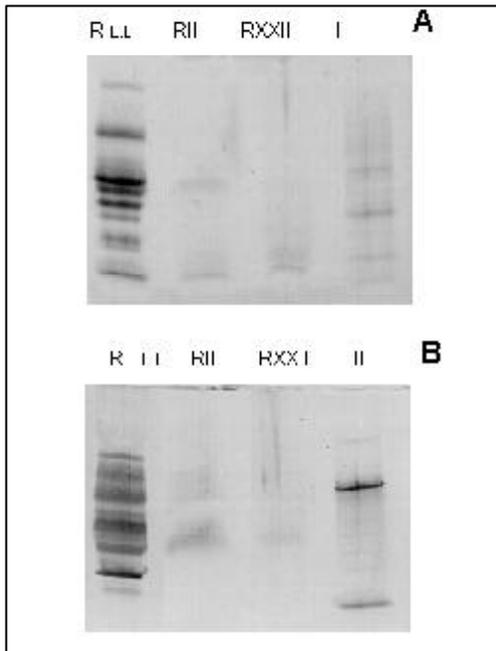


Figura 6. A. SDS-PAGE de proteínas totales en interacciones compatibles e incompatibles de roya (*Hemileia vastatrix*) y café (*Coffea* sp). B. Western Blot.

alguna ó algunas de las proteínas que aparecen como producto de la interacción sea o sean constitutivas del patógeno, o quizás sea un producto propio de eventos normales de su desarrollo. Por tanto, algunos productos proteínicos nuevos propios de la roya y no de la interacción, pueden aparecer en los perfiles proteínicos. Para comprobar la presencia de ese tipo de proteínas se realizaron Western Blot con anticuerpos policlonales de roya raza II (Figura 6). Se encontró la presencia de proteínas comunes entre la roya y el café, bien sea sano ó inoculado con las dos razas del patógeno, como lo demostró Gunturiz (10), utilizando técnicas de ELISA indirecto. Así mismo, se observó reconocimiento de numerosas proteínas ubicadas en la matriz extracelular en café sano.

Trabajos realizados en cebada y trigo por Holden y Rohringer (14), demuestran que tales proteínas están ligadas a azúcares como

a-D-N acetylglucosamina, formando glicoproteínas que pueden ser reconocidas por anticuerpos generados contra antígenos provenientes de razas de roya. Sin embargo, la banda de 13KDa específica para interacciones de resistencia no fue reconocida por los anticuerpos desarrollados contra el patógeno, permitiendo concluir que la misma no es un antígeno común entre los dos organismos, ni tampoco es una banda asociada a una proteína del patógeno.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el reconocimiento café-roya es un evento temprano en la patogénesis y sugieren que los genes de virulencia *V* del patógeno que interactúan en una relación incompatible, lo hacen como determinantes de avirulencia *Avr*. Éstos, transmiten señales no proteínicas para las cuales el hospedante posee receptores de membrana, y estas señales son transportadas al núcleo de la célula hospedante donde actúan como inductoras de genes *R* (que actúan como *SH* en interacciones de compatibilidad). Los genes se traducen a proteínas *R*, las cuales determinan la sucesión de otro tipo de señales denominadas elicitores de segundo y tercer orden. Por tanto, en este reconocimiento sucede algo similar a la respuesta hipersensitiva, que es dependiente de numerosos genes pero es activada por uno solo. Aún así, no se generan repuestas drásticas debido al mecanismo de ataque y penetración de este parásito obligado y al grado de coevolución entre ambos organismos.

Se hace necesario plantear nuevas investigaciones que permitan conocer en detalle cuáles proteínas así como qué genes están involucrados en el reconocimiento raza-específico. La identificación de estas moléculas y del sitio donde el reconocimiento tiene lugar, son fundamentales para establecer en el futuro, metodologías que permitan la detección de hospedantes susceptibles o resistentes a

determinadas razas, y el diagnóstico rápido de razas de roya similares a los desarrollados en otros patosistemas. Esto permitirá agilizar los programas de mejoramiento genético del café para conseguir resistencia a roya y a otros patógenos.

LITERATURA CITADA

1. ALMARIO, F. Estudio de la actividad de la fenilalanina amonio liasa en presencia de *Hemileia vastatrix* en variedades resistentes y susceptibles a *Hemileia vastatrix* Berk y Br. Santafé de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 1992. 155 p. (Tesis: Magister en Ciencias en Química).
2. ALMARIO, F.; OCAMPO, C. A.; MONTES DE G., V. Establecimiento de un método para determinar la actividad de la L fenilalanina amonio liasa (PAL) en café. *Revista Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 19 (72): 137- 140. 1994.
3. BARRERO M., L. S. Aislamiento y caracterización parcial de un elicitor derivado de tubos germinales de la roya del café *Hemileia vastatrix* Berk y Br. Santafé de Bogotá, Universidad de los Andes, 1994. 106 p. (Tesis: Magister en Microbiología).
4. BRADFORD, M. M. Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
5. CASTILLOZ, J.; LEGUIZAMÓN C., J. E. Virulencia de *Hemileia vastatrix* Berk y Br determinada por medio de plantas diferenciales de café en Colombia. *Cenicafé* 43 (4): 114 – 124. 1992.
6. DAZA, M. C. Contribución al estudio de las superóxido dismutasas en la interacción *Coffea arabica* L. - *Hemileia vastatrix*. Santafé de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 1990. 155 p. (Magister en Química)
7. FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA – FEDERACAFÉ. BOGOTÁ. COLOMBIA; CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ – CENICAFÉ. SECCIÓN DE AGROCLIMATOLOGÍA. CHINCHINÁ. COLOMBIA. Archivos meteorológicos 1959 - 1997. Chinchiná, CENICAFÉ, 1997.
8. FLOR, H. H. Host - parasite interactions in flax rust its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680 - 685. 1965.
9. GIL V., L. F.; OCAMPOM., J. D. Identificación de la raza XXII (SH5-6) de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. en Colombia. *Cenicafé* 49(4): 340-344. 1998. (Nota Técnica).
10. GUNTURIZ, M. L. Determinación de antígenos comunes en la relación *Hemileia vastatrix* Berk y Br. y *Coffea* spp. Santafé de Bogotá, Universidad Nacional. Facultad de Ciencias, 1995. 214 p. (Tesis: Biología)
11. GUZZO, S. D.; BACH, E. F.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. Crudes exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection on coffee plant against *Hemileia vastatrix*. *Journal of Phytopathology* 193: 119-128. 1993.
12. GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β 1-3 glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. In: *Journal Phytopathology* 144: 449 - 454. 1996.
13. HANSON, L. A. Early events in the interaction between maize and southern rust. *Maydica* 42: 339– 346. 1997.
14. HOLDEN, D. W.; ROHRINGER, R. Proteins in intercellular washing fluid from noninoculated and rust-affected leaves of wheat and barley. *Plant Physiology* 78: 715-723. 1985.
15. JONES, D. A.; JONES, J. D. G. Leucine rich repeat proteins in plant defenses. *Advances in Botanical Research* 24: 89-167. 1997.
16. JOOSTEN, M. A.; COZIJNZEN, T. J. DE WITT, P. G. G. M. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single pair change in avirulence genes. *Nature* 367: 384-386. 1994.
17. KLEMENT, Z. Methods of obtaining fluid from the cellular spaces from foliage as substrate for phyto-bacterial pathogens. *Phytopathology* 55: 1033-1034. 1965.
18. MARTÍNEZ, P.; RESTREPO, P. Detección y localización de PFO y PAL en hojas de café caturra y efecto de un fungicida cúprico sobre actividad de estas enzimas. Santafé de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 1981. 98 p. (Tesis: Químico)
19. MÜNCH G., S. Expression of β 1-3 g lucanase and chitinase in healthy stem-rust-affected and elicitor-

- treated near isogenic wheat lines showing *Sr-5* or *Sr-24* - specified race - specific rust resistance. *Planta* 201: 235-244. 1997.
20. NÜREMBERG, T. Signal perception in plant pathogen defense. Multiautor review signaling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 297-302. 1999.
 21. ROJAS V., M. L.; MONTES DE G., V.; OCAMPO V., C. A. Stimulation of lipoxigenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively of the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43(3): 209-219. 1994.
 22. SÁNCHEZ P., P. D.; VANEGAS, M. Estudio de la actividad de la PAL en interacciones compatibles e incompatibles cafeto - roya. Santafé de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 1994. 88 p. (Tesis: Química)
 23. SHEWRY., P.; LUCAS J. Plant protein that confer resistance to pest and pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 50-67. 1992.
 24. TIMMONS, T.; DUNBAR, B. Protein blotting and immunodetection. In: DEUTSCHER, M. P. *Methods in enzymology*. Vol. 182. Guide to protein purification. San Diego, Academic Press, 1990, p. 679-687.
 25. TOBAR C., M.; ZAMORA E., H.; Determinación de fenilalanina amonio liasa en extractos de hojas de cuatro variedades de café y otros tejidos vegetales. Santafé de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 1982. 124 p. (Tesis: Químicos)
 26. VERGARA, M. Evaluación de lectinas para identificación de razas de *Hemileia vastatrix*. Manizales, Universidad Católica de Manizales. Programa de Maestría en Ciencias, 1997. 100p. (Tesis: Magister en Ciencias).
 27. VINASCO O., C. A. Informe sobre la colaboración de la Dra Sielke Sievers en la obtención de líquido de lavado intercelular (L.L.I.) de hojas de café. Chinchiná, Cenicafe, 1982. 10p.