

DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES DURANTE EL CRECIMIENTO DE *Lecanosticta* ANAMORFO DE *Scirrhia acicola*

ROSA MARIA ALONSO¹, ILEANA PELAEZ², IRALDIS MARIA ORTIZ³,
YOLANDA OSORIA³ Y PILAR PEREZ⁴

RESUMEN

A partir de tortas miceliales obtenidas en medio líquido, se determinó el contenido de proteínas solubles del hongo *Lecanosticta* anamorfo de *Scirrhia acicola* (Dearn) Siggers en el tiempo, utilizando comparativamente dos métodos cuantitativos de extracción (Lowry y Bradford). Esto servirá de base para iniciar el estudio del metabolismo del nitrógeno en el referido patógeno fungoso, con vistas a localizar en el futuro patotipos genéticamente resistentes a la enfermedad producida por este hongo. De los 11 días de cultivo, en el séptimo se obtuvo la mayor concentración proteica.

Manuscrito recibido para su publicación 3 de febrero de 1988

¹ Investigador agregado y ⁴ técnico medio
Instituto de Investigaciones Forestales
Calle 174 No. 1723 entre 170
Siboney, Playa, La Habana, Cuba

² Investigador agregado
Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

³ Estudiantes de Ingeniería Forestal
Centro Universitario da Pinar del Río, Cuba

INTRODUCCION

La enfermedad conocida como mancha parda de los pinos es una de las que mayores afectaciones produce actualmente en Cuba en las especies Pinus caribaea Morelet, P. cubensis Griseb y P. maestrensis Bisse.

La búsqueda de los medios más eficaces para su control, sobre la base del estudio y la caracterización del agente causal, Lecanosticta anamorfo de Scirrhia acicola (Dearn) Siggers es uno de los objetivos fundamentales dentro del marco de la protección al bosque en el Instituto de Investigaciones Forestales; por lo que teniendo en cuenta esta necesidad, se ha iniciado un estudio hacia la caracterización de patotipos o razas diferentes del agente causal de la enfermedad, la cual consiste en la obtención de patrones electroforéticos de proteínas solubles del mismo.

Con la determinación de los patotipos, las condiciones ecogeográficas y el endemismo de las especies, se podrá definir qué variedades, especies de pino o ambas, dentro de las tres especies atacadas por este patógeno, se deben plantar en una región u otra, a fin de que sean inmunes o menos susceptibles al ataque del mencionado hongo. A su vez, el análisis de las proteínas de cada patotipo permitirá definir las características del organismo vivo a partir de la información genética contenida en el ácido desoxirribonucleico (DNA). Las diferencias supuestas podrán detectarse por la masa y la carga eléctrica de las proteínas utilizando el método electroforético.

Por todo lo expuesto anteriormente, es objetivo del presente trabajo conocer el momento de mayor concentración proteica de L. acicola mediante el empleo de un método confiable y de utilidad práctica.

MATERIALES Y METODOS

El aislamiento de L. acicola se obtuvo a partir de muestras foliares de Pinus caribaea variedad caribaea Morelet, procedentes de la localidad El Winche, en Pinaros de Mayarí, provincia de Holguín.

En erlenmeyers de 100 mL con caldo de chícharo (Pisum sativum Lin.) y sulfato de amonio al 0,2 % de acuerdo con Alonso et al (1987, inédito) fueron transferidos discos miceliales de 0,1 mm. Los frascos se mantuvieron en oscuridad, a 30°C y en movimiento constante en baño de María a 150 rpm.

Las muestras de micelio fueron tomadas aleatoriamente a los 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 días de crecimiento. Cada una fue filtrada, lavada con agua destilada hasta obtener un pesaje de 10 g por muestra

para cada día de crecimiento, y se puso en congelación hasta el momento de procesarlas.

Para el procesar-tiento se toman los 10 g de la torta micelial congelada (**-4°C**) correspondiente a cada día de crecimiento, se echan en morteros colocados en una bandeja con hielo y se maceran mezclándolas con arena sílice y 5 mL de buffer frío que contiene tris (50 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1mM), EDTA (10mM) y mercaptoetanol (10mM) a pH 7,6.

Finalmente se filtran y centrifugan a 2 500 gravedades durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante.

Se tomaron alicuotas de éste para la contabilización proteica que se realizó por los métodos de Lowry et al. (1951) y de Bradford (1976); en ambos casos se utilizó albúmina de suero bovino (**BSA**) como proteína patrón.

Los datos de concentración proteica para cada día de crecimiento obtenidos por ambos métodos cuantitativos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza con arreglo factorial, método x edad (2 x 8). La significación de la interacción se analizó por la prueba de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el análisis de varianza con arreglo factorial (2 x 8) se refleja que existen diferencias significativas al 0.1 % en la interacción de los dos factores (método x días de crecimiento).

La prueba de Duncan (Tabla 1) muestra que para todas las edades el método de Lowry da como resultado concentraciones mayores de proteínas que el método de Bradford, lo que pone de manifiesto la interferencia del método de Lowry informada por la literatura, lo cual coincide con los resultados de Chiappelli et al. (1979), Peláez y Piñón (1986).

Los contenidos de proteínas detectados por el método de Lowry para los días de crecimiento 5., 6. y 7. son los mayores y no difieren entre ellos, aunque sí con el resto de los tratamientos. Con el método de Bradford los valores más altos de concentración proteica se obtienen a los siete días, y difieren significativamente del resto de los tratamientos; a continuación, en el quinto y sexto días de crecimiento, se observan valores altos de proteínas, sin diferencia entre sí. Esto nos hace pensar que a los siete días de crecimiento es el momento Óptimo del micelio para trabajos bioquímicos con el hongo Lecanosticta acicola.

Para ambos métodos a los 11 días de crecimiento se presentan los valores más bajos de contenido proteico, o sea, que con la edad del micelio disminuyó la concentración de proteínas, resultados que concuerdan con Burrell et al. (1966) y con Peláez y Fernández (1985a).

TABLA 1. Comparación de las medias de concentración de proteínas solubles obtenidas por dos métodos cuantitativos en **ocho** edades del hongo Lecanosticta anarnorfo de Scirrhia acicola (Dearn) Siggers.

Tratamientos		Medias de la concentración proteica (mg/mL)
Método	Edad	
Lowry	6 días	6,81 ^a
	5 días	6,66 ^a
	7 días	6,66 ^a
	2 días	3,57 ^b
	8 días	3,34 ^b
	9 días	3,34 ^b
	10 días	3,14 ^c
	11 días	2,69 ^c
Bradford	7 días	2,29 ^e
	5 días	2,04 ^f
	6	1,92 ^{fg}
	2 días	1,79 ^g
	9 días	0,58 ^h
	8 días	0,45 ^{hi}
	10 días	0,27 ⁱ
	11 días	0,23 ⁱ
ES _x = 0,081 7		

Burrell et al. (ob. cit.) plantean que especies de Phytophthora De Bary con tres días de crecimiento presentan el contenido proteico mayor. Por otra parte, se halló por Peláez y Fernández (ob. cit.) que la mayor concentración de proteínas miceliales en cultivos del hongo Diplodia natalensis Pole Evans se encuentra entre los 9 y 11 días de crecimiento; estos mismos autores (1985b) concluyen que con Phomopsis citri Faw., a los cinco días de cultivo es que se obtiene el mayor contenido proteico. Las diferencias encontradas pueden deberse al patógeno de que se trate, a las condiciones de cultivo, o a ambas.

En la Figura 1 se presenta la tendencia de la curva de variación proteica detectada por los métodos de Lowry Bradford en el tiempo con el hongo Lecanosticta acicola.

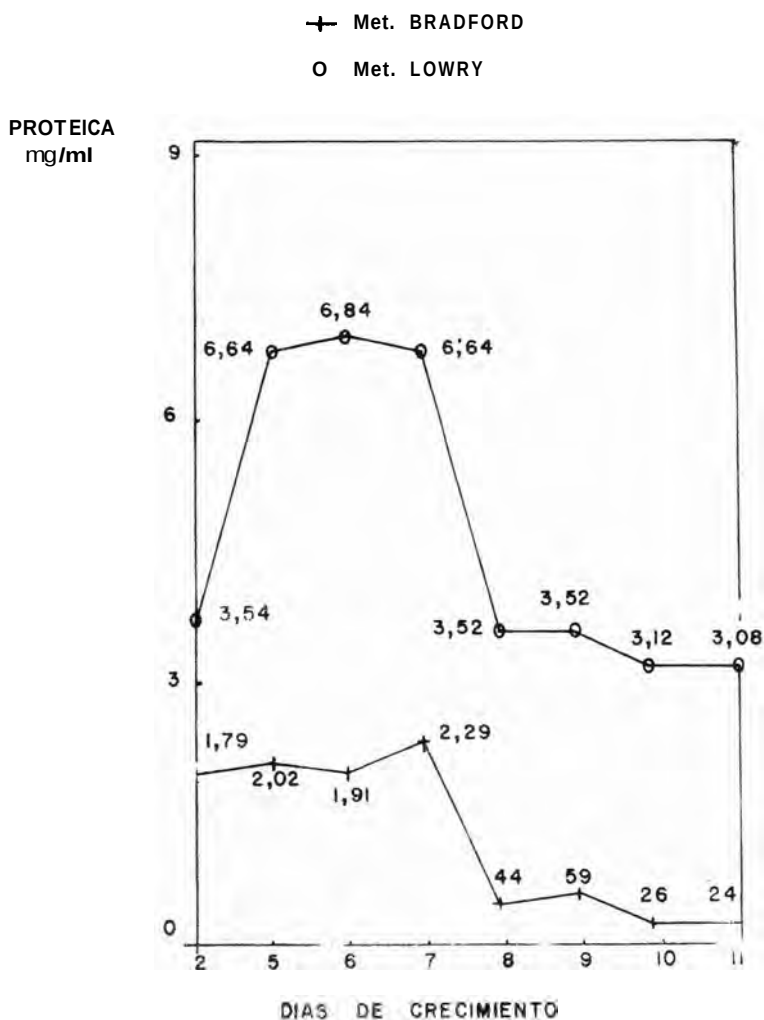


FIGURA 1. Variación de la concentración proteica con la edad en el hongo Lecanosticta anamorpho de Scirrhia acicola detectada por dos métodos cuantitativos.

Se distingue que el método de Lowry detecta contenidos proteicos superiores al método de Bradford, según se comprobó estadística y gráficamente. Además, se observa que a los siete días de crecimiento, es el momento más adecuado para trabajos bioquímicos donde se requiera una alta concentración de proteínas de acuerdo con los métodos cuantitativos utilizados.

De forma general se detecta decrecimiento de la concentración proteica con la edad del micelio después de un incremento y un valor Óptimo obtenido con el tiempo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La mayor concentración proteica se obtuvo a los siete días de crecimiento teniendo en consideración los resultados de ambos métodos. Se recomienda emplear este método en trabajos bioquímicos que requieran una alta concentración de proteínas.

El método de Lowry detecta valores de proteínas mayores que el método de Bradford. Dadas las interferencias del método de Lowry (reconocidas en la literatura y en los resultados obtenidos en este ensayo), se recomienda el método de Bradford para contabilizar las proteínas solubles en hongos.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOLUBLE PROTEINS DURING GROWTH OF *Lecanosticta* ANAMORPHOUS OF *Scirrhia acicola*

From mycelial mass obtained in liquid medium, soluble protein content of fungus *Lecanosticta* anamorphous of *Scirrhia acicola* (Dearn) Siggers was quantified with time, using comparatively two extraction methods (Lowry and Bradford). This will be the basis for nitrogen metabolism studies on this fungous pathogen to locate genetically resistant pathotypes to the disease produced by this fungus in the future. Of the eleven days under culture, the seventh gave the highest protein concentrations.

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, ROSA Ma., NIURKA REVE y PILAR PEREZ. Comportamiento de Lecanosticta acicola en distintas condiciones de laboratorio. (inédito, 1987).
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.
- BURRELL, R. G., W. C. CLAYTON, E. M. GALLEGLY and G. V. LILLY. Factors affecting the antigenicity of the mycelium of three species of Phytophthora. Phytopathology 56: 422-426, 1966.
- CHIAPPELLI, F., A. VASIL and D. F. HAGERTY. The protein concentration of crude cell and tissue extracts as estimated by the method of dye binding: Comparison with the Lowry method. Anal. Biochem. 94: 160-165, 1979.
- LERCH, G. La Experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. -- La Habana: Ed. Científico-Técnica, 1977. -- 452 p.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and P. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-267, 1951.
- PELAEZ, ILEANA y ANA I. FERNANDEZ. Determinación de la variación de la concentración proteica en el tiempo con el hongo Diplodia natalensis. Cienc. Agric. 25: 3-7, 1985a.
- PELAEZ, ILEANA y ANA I. FERNANDEZ. Determinación de las relaciones antigénicas entre los hongos Diplodia natalensis y Phomopsis citri. Cienc. Agric. 23: 8-13, 1985b.
- PELAEZ, ILEANA y DOLORES PÉREZ. Comparación de dos métodos para cuantificar las proteínas solubles en hojas de caña de azúcar. Cienc. Agric. 28: 19-23, 1986.