

GENES DE DEFENSA EN PLANTAS

P. CARBONERO

Fco. GARCIA OLMEDO

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Biotecnología-UPM
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 28040 Madrid

RESUMEN

Se revisan los avances realizados en la caracterización de los genes que codifican para ciertas familias de proteínas vegetales que son tóxicas o inhibitorias frente a insectos, hongos y bacterias. La caracterización incluye el estudio *in vitro* de las propiedades de las proteínas purificadas y la experimentación *in vivo* con plantas transgénicas que expresan los genes correspondientes.

PALABRAS CLAVE: FALTA

INTRODUCCION

Las plantas poseen genes cuyos productos son tóxicos o inhibitorios para otros sistemas biológicos, tales como insectos o patógenos, y a los que se les supone un papel de defensa. En el presente trabajo se revisan de forma sucinta las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio sobre diversas familias de genes con las mencionadas características (Carbonero *et al.*, 1993; Carmona *et al.*, 1993; García Olmedo *et al.*, 1987, 1989, 1992).

Inhibidores de enzimas digestivas de insectos

Se han caracterizado más de 20 miembros de una familia de inhibidores proteicos del endospermo de los cereales que presentan actividad frente a enzimas hidrolíticas (α -amilasas y proteasas) del tracto digestivo de insectos fitófagos (Carbonero *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1990). Ciertos miembros de esta familia de proteínas son también los principales alérgenos responsables del «asma del panadero» (Sánchez-Monge *et al.*, 1992). Los genes de esta familia han sido localizados en cinco de los siete grupos de cromosomas homeólogos de estas especies y codifican para subunidades proteicas que pueden funcionar como monómeros, homodímeros, o heterotetrámeros, en el caso de los inhibidores de α -amilasas, o como monómeros, en el caso de los de tripsina.

Se han realizado estudios detallados *in vitro* de las variaciones de especificidad de las distintas variantes de inhibidores con respecto a las enzimas hidrolíticas de una amplia gama de insectos (Gutiérrez *et al.*, 1990). A partir de los datos de la secuencia N-terminal de estas proteínas purificadas se han podido clonar muchos de estos genes (Carbonero *et al.*, 1993) y se han expresado transgénicamente en tabaco. En la Tabla 1 se muestran los resultados de experimentos *in vivo* realizados con un inhibidor de tripsina y otro de α -amilasa (en colaboración con el Dr. P. Castañera). Tanto las observaciones con enzimas de insectos *in vitro* como dichos resultados *in vivo* son congruentes con el papel de defensa propuesto y

TABLA 1
BIOENSAYO DE DISCOS FOLIARES DE TABACOS TRANSGENICOS
FRENTE AL INSECTO AGROTIS IPSILON

Foliar disc bioassay of transgenic tobacco versus the insect Agrotis ipsilon

Dieta	% mortandad (L1-L3)*
TABACOS TRANSGENICOS	
Inhibidor Tripsina Cebada (CMe)	
planta n.º 2	22,6
planta n.º 3	62,8**
planta n.º 4	52,5**
planta n.º 6	30,0**
Inhibidor α -amilasa Trigo (0,28)	
planta n.º 7	72,7**
planta n.º 8	17,4
planta n.º 9	30,3**
planta n.º 12	57,0**
CONTROLES	
Tabaco sin transformar	15,0
Dieta artificial	14,5

* L1 = estadio larvario 1, L3 = estadio larvario 3. *L1 = larval stage 1; L3 = larval stage 3*

** Mortandad significativamente superior a los controles. *Death rates significantly higher than those of controls*

demonstran el potencial de la utilización de estos genes en la mejora de plantas por ingeniería genética.

Proteínas activas contra patógenos bacterianos y fúngicos

Se ha adoptado una estrategia general para la identificación de posibles proteínas y genes de defensa y para la utilización de estos últimos en la obtención de plantas transgénicas resistentes a las enfermedades. Se han seguido las siguientes etapas:

- i) Purificación sistemática de proteínas vacuolares y de pared celular a partir de distintos taxa y selección de las que mostraban propiedades antimicrobianas.
- ii) Caracterización de sus interacciones *in vitro* con distintos patógenos individualmente o en combinación.
- iii) Determinación de las secuencias de aminoácidos N-terminales de estas proteínas.
- iv) Clonaje de los cDNAs y de los DNAs genómicos correspondientes.
- v) Estudio de la expresión de estos genes durante el desarrollo normal y en respuesta a patógenos.
- vi) Expresión transgénica de dichos genes en fondos genéticos apropiados.
- vii) Ensayo de las plantas transgénicas frente a patógenos apropiados.

Se han identificado una serie de familias proteicas que representan distintos mecanismos de defensa, así como actividades diferenciales frente a distintos

patógenos bacterianos y fúngicos (Molina *et al.*, 1993; Segura *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1994; Piñeiro *et al.*, 1994). Las distintas proteínas pueden complementarse y actuar sinérgicamente (Molina *et al.*, 1993). Existe variabilidad en la susceptibilidad de distintas cepas de una misma especie de patógeno frente a una proteína dada. Se han obtenido mutantes bacterianos resistentes a proteínas de defensa y se han clonado los genes mutados (Titarenko y Rodríguez-Palenzuela, en preparación).

La expresión transgénica de genes de defensa bajo promotores constitutivos aumenta la resistencia a patógenos en fondos genéticos apropiados (Carmona *et al.*, 1993). En el desarrollo normal de la planta, la expresión de estos genes y la distribución de las correspondientes proteínas son congruentes con el papel de defensa (Molina, García Olmedo, 1993; Segura *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1994). La respuesta de estos genes a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos, en el caso de la cebada, se resume en la Tabla 2.

TABLA 2

RESPUESTA ($n \times$ NIVEL BASAL DE mRNA) DE GENES DE DEFENSA EN CEBADA A ESTIMULOS ABIOTICOS Y A PATOGENOS (C/I, COMPATIBLE/INCOMPATIBLE; -, SIN EFECTO)

Responses ($n \times$ basal mRNA levels) of defense genes in barley to abiotic stimuli and pathogen infection (C/I, compatible/incompatible; -, no effect)

Tratamientos	C/I**	Genes***						
		Ltp2	Ltp3	Ltp4	Gr11	Gr21	Th	Pr1
ABIOTICOS/cv Bomi								
Salinidad		2	-	2	2	-	-	-
Frio		-	-	-	4	3	-	-
Sequía		-	-	-	-	-	4	-
Herida		-	-	-	-	-	-	-
Metil-jasmonato		,05	,06	,10	0	0	20	0
Acido abscisico		5	2	3	2	-	3	7
Etileno		-	-	-	-	-	-	-
Ethephon		-	-	-	-	-	-	3
Salicilato		-	-	-	-	-	-	7
Ac. Isonicotínico		-	-	-	-	-	2	-
PATOGENO/cv								
<i>Erysiphe graminis</i>								
(Av6)/Pallas	I	3	3	9	7	5	3	6
(vir6)/Pallas	C	3	3	8	7	4	3	6
<i>Rjycosp. secalis**</i>								
/Atlas46	I	3	-	10	5	4	4	10
/Atlas	C	-	-	-	5	4	4	-
/Turk	I	4	-	16	5	4	-	20
/Hannchen	C	-	-	-	5	4	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>								
(153)/Bomi	I	-	-	-	-	-	-	-
(DC3000)/Bomi	C	-	-	-	-	-	5	4

* Filtros para análisis Northern de L. Boyd (Norwich) y ** de W. Knogge (Köln). *Filters from L. Boyd (Norwich) and ** W. Knogge (Köln)*

*** Proteínas de transferencia de lípidos (Ltp); Proteínas ricas en glicina (Gr); Tioninas (Th); Proteínas relacionadas con la patogénesis (Pr). *Lipid transfer proteins (Ltp); glycin-rich proteins (Gr); thionins (Th); pathogenesis-related proteins (Pr)*

Las observaciones anteriores muestran la plasticidad y el carácter combinatorio de la respuesta de los genes de defensa a estímulos externos y permiten introducir nuevos elementos en los modelos actuales de interacción patógeno/planta:

- a) Distintos genes de defensa pueden ser activados a través de rutas y/o receptores total o parcialmente independientes, una combinación de los cuales se activa por cada patógeno.
- b) Genes de defensa que se expresan basalmente en el desarrollo normal pueden ser inactivados por señales de supresión producidas por el patógeno.
- c) La respuesta inducida por ser *gratuita* si las proteínas inducidas no son activas frente al patógeno inductor.
- d) La interacción compatible puede resultar no sólo del fallo por parte de la planta de reconocer una cepa dada del patógeno, sino también de la capacidad de dicha cepa de ser resistente a las proteínas inducidas.
- e) Los niveles basales de expresión de los genes de defensa pueden ser responsables de los niveles basales de resistencia por un mecanismo no mediado por la reacción hipersensible.
- f) Las mismas proteínas de defensa pueden involucrarse en las situaciones descritas (a-e).

SUMMARY

Defense Genes in Plants

Advances in the characterization of genes encoding proteins that are toxic or inhibitory towards insects, fungi in bacteria, are reviewed. These involve studies of the *in vitro* properties of the purified proteins and *in vivo* experiments with transgenic plants expressing the corresponding genes.

KEY WORDS: Falta

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CARBONERO P., SALCEDO G., SANCHEZ-MONGE R., GARCIA-MAROTO F., ROYO J., GOMEZ L., MENA M., MEDINA J., DIAZ I., 1993. A multigene family from cereals which encodes inhibitors of trypsin and heterologous α -amylases. In *Innovations in Proteases and their inhibitors* (Aviles F. X., ed.) pp. 333-348. Walter de Gruyter. Berlín, New York.
- CARMONA M. J., MOLINA A., FERNANDEZ J. A., LOPEZ-FANDO J. J., GARCIA-OLMEDO F., 1993. Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J* 3: 457-462.
- GARCIA-OLMEDO F., CARMONA M. J., LOPEZ-FANDO J. J., FERNANDEZ J. A., CASTAGNARO A., MOLINA A., HERNANDEZ-LUCAS C., CARBONERO P., 1992. Characterization and analysis of thionin genes. In *Genes involved in plant defense* (Boller T., Meins F., eds.) *Plant Gene Research*, pp. 283-302. Springer-Verlag. Wien, New York.
- GARCIA-OLMEDO F., RODRIGUEZ-PALENZUELA P., HERNANDEZ-LUCAS C., PONZ F., MARAÑA C., CARMONA M. J., LOPEZ-FANDO J. J., FERNANDEZ J. A., CARBONERO P., 1989. The thionins: a protein family that includes purothionins, viscotoxins and crambins. *Oxford Surveys Plant Mol Cell Biol* 6: 31-60.
- GARCIA-OLMEDO F., SALCEDO G., SANCHEZ-MONGE R., GOMEZ L., ROYO J., CARBONERO P., 1987. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. *Oxford Surveys Plant Mol Cell Biol* 4: 275-334.
- GUTIERREZ C., SANCHEZ-MONGE R., GOMEZ L., RUIZ-TAPIADOR M., CASTAÑERA P., SALCEDO G., 1990. α -Amylase activities of agricultural insect pests are specifically affected by different inhibitor preparations from wheat and barley endosperm. *Plant Sci* 72: 37-44.

- MOLINA A., GARCIA-OLMEDO F., 1993. Developmental and pathogen-induced expression of three genes encoding lipid transfer proteins in barley. *Plant J* 4: 893-991.
- MOLINA A., SEGURA A., GARCIA-OLMEDO F., 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett* 316: 119-122.
- MORENO M., SEGURA A., GARCIA-OLMEDO F., 1994. Pseudothionin-StI, a potato peptide active against potato pathogens. *Eur J Biochem* (in press).
- PIÑEIRO M., GARCIA-OLMEDO F., DIAZ I., 1994. Redox modulation of the expression of bacterial genes encoding cysteine-rich proteins in plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3867-3871.
- SANCHEZ-MONGE R., GOMEZ L., BARBER D., LOPEZ-OTIN C., ARMENTIA A., SALCEDO G., 1992. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. *Biochem J* 281: 401-405.
- SEGURA A., MORENO M., GARCIA-OLMEDO F., 1993. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett* 3: 243-246.