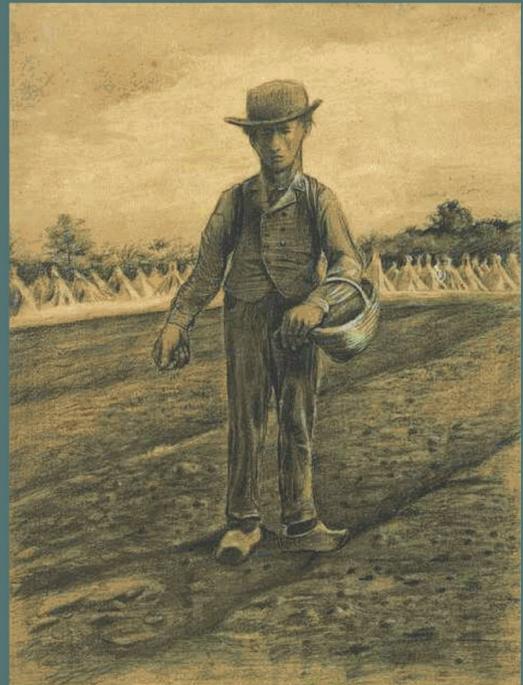


# FITOPATOLOGÍA MOLECULAR

colección textos

textos  
textos  
textos  
textos  
textos  
textos  
textos

Camilo Ernesto López C.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS

Facultad de Ciencias  
Saber más y formar mejor

# **FITOPATOLOGÍA MOLECULAR**

CAMILO ERNESTO LÓPEZ C.



# **FITOPATOLOGÍA MOLECULAR**

CAMILO ERNESTO LÓPEZ C.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

---

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

## **FITOPATOLOGÍA MOLECULAR**

© Camilo Ernesto López C.

Laboratorio de Fitopatología Molecular  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional de Colombia

© Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología

Ignacio Mantilla Prada, Decano  
Eugenio Andrade, Vicedecano Académico  
Jorge Ortiz Pinilla, Director de Publicaciones

Primera edición, 2007  
Bogotá, Colombia

ISBN 978-958-701-924-7

Impresión:  
Proceditor Ltda.  
proceditor@etb.net.co, proceditor@yahoo.es  
Bogotá, Colombia

Diseño de carátula y diagramación: Andrea Kratzer M.

Imágenes carátula: Harvest at La Cra. Van Gogh Museum, Amsterdam, Holanda.  
Blossoming Almond Tree. Van Gogh Museum, Amsterdam, Holanda.  
Sower with Basket. Kröller-Müller Museum, Otterlo, Holanda.

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

López Carrascal, Camilo Ernesto, 1963-  
Fitopatología Molecular / Camilo López. - Bogotá : Universidad Nacional de  
Colombia. Facultad de Ciencias, 2007  
145 p.

ISBN : 978-958-701-924-7

1. Patología vegetal 2. Patología molecular

CDD-21 571.92 / 2007

*Una vez más, a mis padres,  
a mis hermanas  
y a mi sobrino Pablo.*



# CONTENIDO

Prefacio . . . . .	11
<b>I. IMPORTANCIA DE LA FITOPATOLOGÍA . . . . .</b>	<b>13</b>
LOS PROTAGONISTAS . . . . .	16
<b>II. LOS PATÓGENOS . . . . .</b>	<b>16</b>
A. Virus . . . . .	18
B. Bacterias . . . . .	19
C. Hongos . . . . .	19
D. Nemátodos . . . . .	20
<b>III. MECANISMOS DE PENETRACIÓN, COLONIZACIÓN Y PROPAGACIÓN . . . . .</b>	<b>22</b>
A. Virus . . . . .	22
B. Bacterias . . . . .	24
C. Hongos . . . . .	27
1. Penetración directa por fuerza mecánica . . . . .	27
2. Penetración directa por acción enzimática . . . . .	29
3. Propagación . . . . .	30
D. Nemátodos . . . . .	31
<b>IV. ARMAS QUÍMICAS DE LOS PATÓGENOS . . . . .</b>	<b>33</b>
A. Enzimas . . . . .	33
B. Toxinas . . . . .	33
C. Hormonas . . . . .	36
D. Polisacáridos . . . . .	36
E. Detoxificadores . . . . .	37

LOS PROTAGONISTAS: LAS PLANTAS . . . . .	39
<b>V. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LAS PLANTAS . . . . .</b>	<b>39</b>
A. Defensas constitutivas . . . . .	40
B. Mecanismos de defensa inducidos . . . . .	41
<b>VI. LA RESISTENCIA . . . . .</b>	<b>42</b>
A. Resistencia cuantitativa . . . . .	42
B. Resistencia cualitativa . . . . .	44
C. Resistencia no hospedero . . . . .	45
PRIMER ACTO: EL RECONOCIMIENTO . . . . .	47
<b>VII. LOS GENES R . . . . .</b>	<b>47</b>
A. Los dominios estructurales . . . . .	53
1. El dominio LRR . . . . .	53
2. El dominio NBS . . . . .	55
3. El dominio TIR . . . . .	56
4. El dominio <i>Coiled Coil</i> . . . . .	57
5. El dominio STK . . . . .	57
6. El dominio WRKY . . . . .	58
B. Función, localización y regulación . . . . .	58
C. Splicing alternativo y formas truncadas . . . . .	60
D. Organización genómica . . . . .	61
E. Genomas y genes <i>R</i> . . . . .	62
F. Evolución . . . . .	64
G. El concepto de <i>arms race</i> . . . . .	65
H. Genes <i>R</i> recesivos . . . . .	66
I. Genes <i>R</i> candidatos . . . . .	67

<b>VIII. GENES EFECTORES O AVR</b> . . . . .	73
A. Genes efectores o Avr en virus . . . . .	73
B. Genes efectores o Avr en bacterias . . . . .	74
1. Sistema de secreción tipo 3 (T3SS) . . . . .	74
2. La familia AvrBs3 . . . . .	78
3. ¿Dónde está la señal de secreción? . . . . .	80
4. Identificación de efectores . . . . .	80
5. Estructura de los efectores . . . . .	84
6. Función . . . . .	85
Inhibición de la PCD . . . . .	86
Supresión del remodelamiento de la pared celular . . . . .	86
Activadores de la vía JA . . . . .	86
Sumolación y degradación proteica . . . . .	87
Inhibidores de las respuestas de defensa basal . . . . .	88
C. Genes efectores o Avr en hongos . . . . .	89
<b>IX. SEGUNDO ACTO: MODELOS DE INTERACCIÓN</b> . . . . .	94
<b>X. TERCER ACTO: LA RESPUESTA DE DEFENSA</b> . . . . .	101
A. Genes de la vía de señalización . . . . .	101
B. Activación de múltiples respuestas . . . . .	103
1. La RH . . . . .	103
2. Flujos iónicos . . . . .	105
3. Producción de ROS . . . . .	105
4. Producción de AS . . . . .	106
5. Producción de ON . . . . .	107
6. MAP kinasas (MAPK) . . . . .	108
7. Refuerzo de la pared celular . . . . .	109
8. Fitoalexinas . . . . .	110
9. Genes <i>PR</i> . . . . .	110
10. Degradación proteica . . . . .	111

<b>XI. CUARTO ACTO: UN ENTRECRUCE DE DIÁLOGOS . . . . .</b>	<b>119</b>
<b>XII. QUINTO ACTO: LA RESPUESTA VA MÁS ALLÁ . . . . .</b>	<b>122</b>
A. ¿Cuál es la molécula señal? . . . . .	123
B. NPR1 . . . . .	124
<b>XIII. SEXTO ACTO: ¡SILENCIO! . . . . .</b>	<b>127</b>
A. Las vías del silenciamiento génico . . . . .	128
B. Fuentes de dsARN . . . . .	130
C. DICER . . . . .	130
D. RdRP . . . . .	131
E. Argonauta y RISC . . . . .	132
F. Supresores del silenciamiento . . . . .	132
G. Aplicaciones del silenciamiento: VIGS . . . . .	133
<b>XIV. ACTO FINAL: ¿TODO ESTARÁ BAJO CONTROL? . . . . .</b>	<b>136</b>
A. El control químico . . . . .	136
B. El control biológico . . . . .	138
C. Mejoramiento genético . . . . .	139
D. La fitopatología molecular entra en juego . . . . .	141

## PREFACIO

*“La ciencia contemporánea ya no nos da imágenes que se puedan representar; el mundo que nos abre está más allá de toda imagen posible”.*

Italo Calvino.

El conocimiento en el campo de la patología vegetal ha avanzado aceleradamente y ya ha superado la identificación y caracterización de muchos de los diferentes agentes patógenos que ocasionan enfermedades en las plantas. Actualmente se dispone de un conocimiento sobre los genes implicados en el reconocimiento y de las rutas bioquímicas que son encendidas como respuesta a los patógenos. El desarrollo de este campo científico permite avanzar en nuevas estrategias para el control de enfermedades, a través de la introducción de genes específicos que generen resistencia.

Durante los cursos universitarios me he dado cuenta de que, a diferencia de muchas otras materias, el campo de la Fitopatología Molecular no posee un libro texto. Una razón de esta inexistencia es quizás el reciente desarrollo en esta área (los primeros genes de resistencia fueron identificados por primera vez hace 15 años). Es posible que se deba igualmente al cambio continuo y acelerado que se ha producido y se está produciendo en este campo científico, aunque para otras áreas del conocimiento se podría plantear este mismo análisis. A pesar de que hay muy buenas revisiones científicas sobre todos los temas abordados en este libro, no existe aún una compilación de toda esta información en una unidad. Si bien es cierto que algunos capítulos de ciertos libros se dedican a las interacciones moleculares plantas-microorganismos, están en inglés y no cubren en detalle muchos de los aspectos que se abordan en este libro. De cualquier modo, para mí ha sido evidente que los estudiantes deberían poseer un libro texto guía en castellano que les brinde un punto de partida hacia la lectura de los artículos científicos sobre el tema.

El libro está estructurado como una obra de teatro en donde se describen los protagonistas y posteriormente estos entran en escena para hacer parte de cada uno de los diferentes actos (capítulos). En cierto sentido mi visión personal es que las relaciones de las plantas con sus patógenos es un continuo diálogo (molecular) como el que se encuentra en las obras de teatro.

Fue difícil estructurar cada uno de los capítulos como entidades separadas puesto que muchas veces para definir cierto tipo de conceptos era necesario poseer nociones de temas que no se habían abordado; de ahí la necesidad de que el lector realice lecturas de secciones ulteriores. Este hecho refleja además la interconexión de los eventos moleculares y bioquímicos que se dan durante la comunicación molecular entre plantas y patógenos.

El enfoque del libro es casi exclusivamente molecular y solo se tocan muy tangencialmente algunas descripciones morfológicas de las enfermedades o de los ciclos de vida de los patógenos. El lector interesado puede consultar el libro de Agrios *Patología vegetal* donde estos temas están muy bien descritos y hermosamente ilustrados. La última edición aborda con cierta profundidad algunos aspectos moleculares de las relaciones de los patógenos con las plantas.

Como libro de Fitopatología Molecular, requiere por parte de sus lectores un conocimiento sobre las bases de la Biología Molecular. Incluso quizás sea más importante poseer sólidas bases en Biología Molecular que en Fitopatología. Este libro no describirá conceptos básicos en Biología Molecular. Para aquellos lectores poco familiarizados con esta disciplina, libros como *Genes y Molecular Biology of the Cell* constituyen una buena base.

En este libro los lectores se encontrarán frecuentemente con las expresiones y la terminología empleadas en la lengua inglesa, dado que se acepta hoy en día que el inglés es el idioma para la comunicación científica y, por tanto, la mayoría de los descubrimientos en el campo que nos ocupa se han reportado en artículos científicos en inglés. Algunas personas “puristas” tratan de traducir los términos científicos al castellano creando nuevas palabras que raramente el lector encontrará en los artículos científicos. Por esta razón he preferido, en la mayoría de los casos, conservar los términos (y las siglas) en inglés y en su acepción original. De esta manera el lector podrá posteriormente remitirse a los artículos científicos sin encontrarse con la confusión de términos inexistentes o aproximativos.

Cada uno de los aspectos abordados en este libro se basa en evidencias experimentales. Aunque dentro del texto no se citan dichos trabajos, al final de cada capítulo se presenta una bibliografía con la literatura que apoya las ideas expuestas. Esta bibliografía, sin ser exhaustiva, permitirá al lector remitirse a los artículos más importantes en el tema y a artículos de revisión.

Dado el rápido desarrollo de la Fitopatología Molecular, he tratado de abarcar cada uno de los aspectos basado en la literatura científica reciente. Muy posiblemente al término de algunos pocos años varios de los conceptos aquí tocados podrán ser revaluados o confirmados y muy seguramente se haga necesaria una nueva edición de este libro. Sin embargo, de cualquier manera este trabajo constituye una primera base para la comprensión de la comunicación molecular y de los elementos que en ella intervienen durante las relaciones de las plantas con sus patógenos.

## I. IMPORTANCIA DE LA FITOPATOLOGÍA

Desde un punto de vista histórico, así como el hombre ha cultivado las plantas para su alimentación, los patógenos que son capaces de infectar las plantas nos han acompañado en este proceso. Las enfermedades en las plantas han sido siempre un problema y un reto para la humanidad, y desde tiempos antiguos siempre se ha tratado de controlarlas y de generar cada vez variedades mejoradas, aún sin conocer los mecanismos genéticos o moleculares subyacentes. Es evidente la importancia de las enfermedades producidas en las plantas en la cultura humana. Uno de los ejemplos más ilustrativos ha sido la hambruna ocurrida en Irlanda en 1845, la cual fue ocasionada por la pérdida de la casi totalidad de los cultivos de papa por *Phytophthora infestans*. Esto provocó la migración de miles de irlandeses a Estados Unidos, con las consecuencias culturales y sociales que ello conlleva.

Las cifras sobre las pérdidas económicas actuales en los cultivos como consecuencia de las enfermedades producidas por fitopatógenos son bastante dicientes. En la tabla 1 se muestran las pérdidas en diferentes cultivos, principalmente los de importancia nacional y para la seguridad alimentaria. Aunque la enfermedad en las plantas se considera más la excepción que la regla, las pérdidas ocasionadas por algunos patógenos pueden llegar a ser devastadoras.

Lo que resulta un tanto paradójico es que la mayor proporción de las pérdidas en los cultivos se encuentra en los países en vías de desarrollo, los cuales basan su economía en la agricultura (tabla 2). Un aspecto aún más preocupante es que justamente en estas regiones es donde hay más problemas de pobreza y hambre. Los estudiosos de la Fitopatología no deben desconocer estos aspectos y deben sentir un compromiso mayor en cuanto que la investigación científica en este campo debe ir encaminada de alguna manera, y dentro de las posibilidades, a la contribución a la solución de dichos problemas.

Actualmente más de 800 millones de personas en el mundo no tienen una alimentación adecuada y más de 1,3 billones viven con menos de un dólar al día. Estas cifras contrastan con el hecho de que al menos el 10% de la producción alimenticia mundial se pierde por las enfermedades de las plantas. Uno de los retos de las Naciones Unidas, el primero y más importante a cumplir antes de 2015, es el de reducir la población que vive en la pobreza (con menos de un dólar al día) y que sufre de problemas de malnutrición. Dado que cerca del 70% de dicha población vive en las zonas rurales, esfuerzos encaminados a aumentar la producción de cultivos redundarían en una mejora en su calidad de vida. Dentro de los aspectos implicados en el aumento en la productividad se encuentra, claro está, el control y manejo de las enfermedades.

La Fitopatología se convierte en un punto de encuentro entre lo que comúnmente denominamos ciencia básica y ciencia aplicada. Los biólogos están en la

búsqueda constante de respuestas que permitan explicar los fenómenos biológicos que observan, dentro de los que se encuentran la resistencia de las plantas, por un lado, y los mecanismos de patogenicidad, por el otro. La sola búsqueda de entender estos mecanismos es un motivo para realizar la investigación en el campo de la Fitopatología. Sin embargo, de manera muy rápida, el conocimiento generado puede tener repercusiones prácticas de vital importancia, ya que este tipo de conocimiento permitirá generar mejores estrategias para el manejo de las enfermedades.

**Tabla 1.** Porcentaje de pérdidas ocasionado por enfermedades en ocho cultivos principales.

Porcentaje de pérdidas en los cultivos				
Cultivo	Patógenos	Insectos	Hierbas	Total
Arroz	15,1	20,7	15,6	51,4
Trigo	12,4	9,3	12,3	34,0
Cebada	10,1	8,8	10,6	29,4
Maíz	10,8	14,5	13,1	38,3
Papa	16,4	16,1	8,9	41,4
Soya	9,0	10,4	13,0	32,4
Algodón	10,5	15,4	11,8	37,7
Café	14,9	14,9	10,3	40,0

**Tabla 2.** Porcentaje de pérdidas ocasionado por enfermedades en los diferentes continentes.

Porcentaje de pérdidas en producción				
Continente	Patógenos	Insectos	Hierbas	Total
África	15,6	16,7	13,6	48,9
Norteamérica	9,6	10,2	11,4	31,2
Suramérica	13,5	14,4	13,4	41,3
Asia	14,2	18,7	14,2	47,1
Europa	9,8	10,2	8,3	28,2
Australia	15,2	10,7	10,3	36,2

En este contexto resulta relevante toda investigación que se realice en el campo de la Fitopatología. Actualmente estamos pasando por un periodo fundamental en la investigación de las enfermedades de las plantas y en las respuestas que ellas encienden frente al ataque de diferentes patógenos. Los grandes desarrollos de la Biología Molecular han permitido identificar los genes de resistencia y los genes de avirulencia presentes en plantas y patógenos

respectivamente. La serie de eventos moleculares que se da después de este reconocimiento o de las estrategias que emplean los patógenos para superar las respuestas de defensa de las plantas y tener acceso a los nutrientes, aunque en su infancia, está comenzando a ser develada. Con avances en las tecnologías entre las que se destacan la genómica y la bioinformática, actualmente contamos con la información de la secuencia completa del genoma de especies vegetales como *Arabidopsis* y arroz y de patógenos como virus, bacterias y hongos. Esta información nos ha permitido y nos permitirá seguir escudriñando el interior de los genomas y de los mecanismos implicados tanto en los procesos de defensa como en las estrategias de patogenicidad.

Es importante que exista una comunicación estrecha entre el sector académico, el investigativo y el productivo y que realicen esfuerzos que impulsen la investigación, lo cual permitirá una mayor comprensión de los mecanismos implicados durante el diálogo molecular que se establece entre plantas y microorganismos. Este esfuerzo colaborativo redundará en la adopción de mejores estrategias para el manejo de las enfermedades de cultivos de importancia económica.

Quisiera terminar esta corta introducción con una frase de Deborah P. Delmer, de la Fundación Rockefeller, que ilustra claramente la importancia de los investigadores comprometidos con el estudio de la Fitopatología y que es además una invitación para que jóvenes estudiantes e investigadores aporten su esfuerzo y su curiosidad hacia una mejor comprensión de los procesos que se dan durante la interacción entre plantas y microorganismos: “*Yo pienso que no existe una área en biología vegetal que posea una colección de científicos más imaginativos que aquellos que han descubierto la impresionante cantidad de información acerca de las vías implicadas en las respuestas de defensa de las plantas a los patógenos o insectos*”.

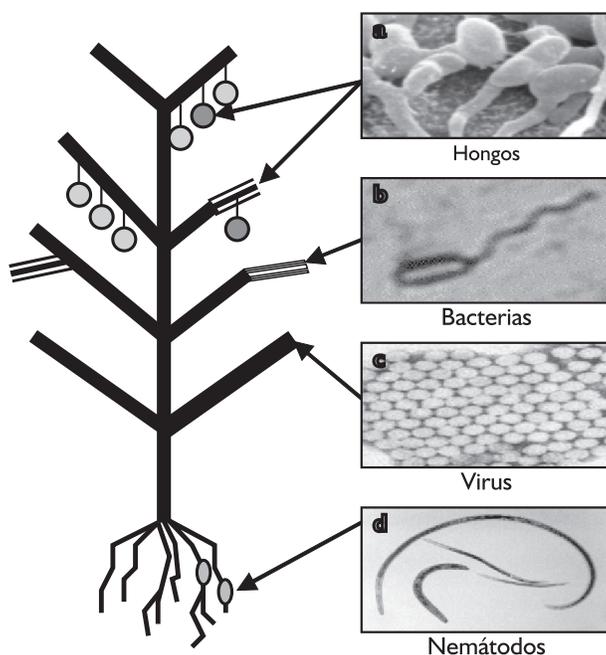
## BIBLIOGRAFÍA

- Delmer, D. P. (2005) Agriculture in the developing world: Connecting innovations in plant research to downstream applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 15739-46.
- Ouchi, S. A. (2006) Retrospective of an Unconventionally Trained Plant Pathologist: Plant Diseases to Molecular Plant Pathology. *Annu Rev Phytopathol*. 44: 1-17.

# LOS PROTAGONISTAS

## II. LOS PATÓGENOS

Los fitopatógenos se definen como aquellos organismos que cumplen una parte o todo su ciclo de vida dentro de las plantas, trayendo como consecuencia un deterioro en el crecimiento y funcionamiento normal de la planta. Los fitopatógenos están representados por virus, bacterias, hongos y nemátodos (figura 1).



**Figura 1.** Diferentes especies de plantas interactúan con una gama amplia de microorganismos como virus, bacterias, hongos y nemátodos, los cuales atacan diferentes órganos de la planta y causan síntomas característicos. a. Tomado de [http://www.fsagx.ac.be/pp/Phytopat/Partie0/Mpinodes\\_appressorium.JPG](http://www.fsagx.ac.be/pp/Phytopat/Partie0/Mpinodes_appressorium.JPG) b. Fotografía cortesía de Valerie Verdier. c. Tomado de <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/images/virus-ganA-picomaviridae-02.jpg> d. Tomado de [http://www.uckac.edu/nematode/images/Copy\\_of\\_nematode1.gif](http://www.uckac.edu/nematode/images/Copy_of_nematode1.gif)

Los patógenos suelen dividirse en tres categorías, según el estilo de vida que emplean dentro de las plantas: necrotróficos, biotróficos o hemibiotróficos.

Los patógenos necrotrófos son aquellos que aniquilan las células vegetales en los primeros estadios de la infección. La muerte de estas células les permite

adquirir los nutrientes necesarios para poder multiplicarse. Como estrategias para la colonización, los patógenos necrotrofos emplean un amplio rango de enzimas que degradan la pared celular vegetal, así como una variedad importante de fitotoxinas. Los necrotrofos producen de esta manera una grave maceración del tejido vegetal. Producto de esta estrategia de ataque, se dice que ellos emplean la “fuerza bruta” como principal mecanismo para la colonización del tejido vegetal. Ejemplos de este tipo de patógenos son las bacterias del género *Erwinia* y hongos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*.

Los biotrofos no matan las células y captan sus nutrientes sin destruirlas, por lo que el daño que le ocasionan al tejido vegetal durante los primeros estadios de la infección es mínimo. Este tipo de interacción implica un íntimo contacto del microorganismo con las células vegetales para así poder captar los nutrientes. Dentro de este tipo de patógenos encontramos royas, mildew, virus, nemátodos y bacterias del género *Pseudomonas*. El ejemplo más claro de este tipo de patógenos lo constituye el Oomycete parásito obligado *Peronospora parasitica*. En este caso las esporas del hongo germinan, desarrollan haustorios y esporulan sin ocasionar la muerte de las células de la planta hospedera.

Quizás la mayoría de los microorganismos poseen estilos de vida que alternan entre los dos extremos que describimos precedentemente y son denominados hemibiotróficos, es decir que en la fase inicial se comportan como biotróficos y en los estadios más avanzados presentan características propias de los necrotrofos. En este caso, las células vegetales sobreviven solamente durante los primeros estadios de la infección, pero a medida que el patógeno se reproduce se va produciendo una muerte celular y un grave daño del tejido vegetal. Así por ejemplo, la bacteria *P. syringae* es frecuentemente considerada como un biotrofo, ocasionalmente como necrotrofo, pero debería ser considerada más como un hemibiotrófico. En este caso, la bacteria penetra a través de heridas y estomas y se multiplica en los espacios intercelulares. Durante los primeros estadios de la infección no ocurre la muerte de las células vegetales, pero a medida que la infección avanza se produce la clorosis y necrosis del tejido vegetal.

Los fitopatógenos, durante el curso de la evolución, han desarrollado estrategias que les permiten vivir gracias a las sustancias nutritivas generadas por las células vegetales y muchos de ellos dependen de estas sustancias para poder sobrevivir. Los patógenos han debido desarrollar estrategias que les permitan tener acceso al interior de las células vegetales donde se encuentran los nutrientes. Para ello los patógenos deben ser capaces de penetrar las barreras estructurales propias que poseen las células vegetales, como la cutícula y la pared celular. Aun en casos en que esta penetración es exitosa, los patógenos han tenido que desarrollar mecanismos para poder degradar las sustancias nutritivas vegetales en compuestos que puedan ser absorbidos y asimilados. Además

de esto, el patógeno se enfrenta con la situación en la cual la planta puede activar una serie de respuestas de defensa, las cuales debe superar para poder continuar su ciclo de vida. Así, para que un patógeno infecte exitosamente una planta debe: *i*) penetrar las barreras estructurales, *ii*) degradar y absorber los nutrientes y *iii*) neutralizar las reacciones de defensa de las plantas. Estos son los retos a los cuales se enfrentan los patógenos y para conseguirlo han desarrollado estrategias particulares.

## A. VIRUS

Cerca de 700 virus tienen la capacidad de infectar un amplio rango de especies vegetales. La mayoría de los genomas de los virus que infectan las plantas, cerca del 90%, son ARNs de cadena sencilla (ssARN) con polaridad (+). Existen también virus con ARN de doble cadena (dsARN), de ADN de doble cadena (dsADN) y de ADN de cadena sencilla (ssADN) como los *Geminivirus*.

Muchos virus pueden infectar un amplio rango de plantas hospederas, produciendo diferente tipo de síntomas en cada una de ellas, lo que ha provocado que un mismo virus sea clasificado con nombres diferentes. Gracias al desarrollo de técnicas en Biología Molecular, actualmente existe un sistema de clasificación viral bastante coherente basado en análisis de secuencia de los ácidos nucleicos que los componen.

Dentro de las enfermedades más importantes producidas por los virus se encuentra el virus del mosaico del tabaco (TMV), el cual ha sido un modelo de estudio viral, no solo en plantas sino también en la determinación y la estructura de los virus en general.

Otros ejemplos de virus importantes son el BYDV (Barley yellow dwarf virus) el cual se distribuye ampliamente en el mundo y es capaz de infectar cerca de

### **BOX I DEFINICIONES**

Los procesos de infección, colonización y reproducción del patógeno son colectivamente llamados patogénesis. Una cepa de un patógeno que es capaz de causar enfermedad es denominada virulenta; mientras que una cepa avirulenta es aquella que no es capaz de infectar un genotipo particular de una especie vegetal determinada.

La inoculación es la entrada en contacto del patógeno con la planta. Los patógenos que entran en contacto con la planta se llaman inóculos; así, el inóculo es cualquier parte del patógeno que puede iniciar una infección. Una unidad de inóculo de cualquier patógeno se denomina propágulo.

150 especies de la familia *Poaceae*, incluyendo la mayoría de cereales que son consumidos por el hombre.

Otro de los virus de importancia es el virus que ataca la yuca, el cual consiste en ADN de cadena sencilla y pertenece al grupo de *Geminivirus*. El virus se encuentra reportado solo en África y no se ha descrito su aparición en Suramérica, el centro de origen de la yuca. Esto demuestra la importancia del cuidado al exportar un cultivo nativo de una región a otra donde puede ser víctima de infecciones por patógenos propios de la nueva región, a los cuales la planta nunca había sido expuesta y para los que difícilmente existirá una fuente de resistencia.

## **B. BACTERIAS**

El número de especies bacterianas que son capaces de infectar plantas es más reducido que el de las que infectan animales. De las casi 1.600 especies bacterianas conocidas, únicamente cerca de 100 son capaces de infectar plantas. A pesar de este relativo bajo número de especies, las enfermedades ocasionadas por bacterias fitopatógenas han sido históricamente devastadoras en los cultivos, particularmente en regiones cálidas y húmedas como los trópicos. La mayoría de las bacterias que producen enfermedades en las plantas pertenecen al grupo Gram-negativas.

Dentro de las especies bacterianas con mayor impacto en la producción de cultivos de interés agronómico se encuentra *Xanthomonas*, la cual posee una amplia gama de hospederos; específicamente *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* que infecta las plantas de arroz y se encuentra en las principales regiones de cultivo. En particular las variedades basmati altamente cultivadas en India son susceptibles, lo que ocasiona periódicamente graves pérdidas en la producción. Otra bacteria de interés agronómico es *Ralstonia solanacearum* que presenta una distribución mundial y es capaz de causar enfermedades en más de 200 especies de plantas diferentes de 50 familias, dentro de las cuales se encuentra la papa.

## **C. HONGOS**

Actualmente se considera que existen cerca de 100.000 especies de hongos conocidas, de las cuales menos del 2% son capaces de colonizar y producir enfermedades en las plantas. Los hongos pueden ser parásitos obligados que dependen enteramente de su capacidad de colonizar las plantas para completar sus ciclos de vida. Otros tienen el potencial de vivir además como saprofitos sobre tejidos muertos y solo cumplen una parte de su ciclo de vida dentro de las plantas.

La mayoría de hongos fitopatógenos pertenecen a la clase Ascomyceta o Basidiomyceta.

La nomenclatura de los hongos suele ser complicada por la presencia de estados sexuales y asexuales en sus ciclos de vida.

Entre los hongos existe una gran variabilidad intraespecífica que puede afectar sus características particulares. La especie *Puccinia graminis*, por ejemplo, es capaz de infectar cereales, pero solo unos individuos particulares infectan trigo, otros cebada y otros diferentes cereales. Este tipo de individuos se definen como “*forma speciale*” (*P. graminis* f. sp. *tritici* para el trigo, por ejemplo). Los individuos dentro de una “*forma speciale*” pueden infectar exclusivamente cierto tipo de variedades o genotipos y entonces se denominan razas o patotipos. La variación fúngica puede ser tan alta que incluso dentro de razas pueden existir individuos con características particulares y entonces se llaman aislamientos.

Una de las principales enfermedades presentes en una amplia gama de especies de interés agronómico como frijol y mango es la Antracnosis, la cual es ocasionada por *Colletotrichum*. Otra enfermedad de gran importancia económica es la producida por el hongo Ascomycete *Pyricularia oryzae* (en su estado sexual se llama *Magnaporthe grisea*), la cual causa pérdidas que van del 10% al 30% en los cultivos de arroz cada año.

Dentro de las enfermedades fúngicas podemos citar a los Oomycetos que por mucho tiempo fueron considerados hongos. Los Oomycetos carecen de cutina en sus paredes celulares, presentan bajo contenido de esterol en sus membranas, su cariotipo básico es diploide y presentan zoosporas biflageladas. Estas características particulares los separan de los hongos. La especie más notoria de los Oomycetos es *Phytophthora infestans* la cual es mundialmente conocida por ser la causante de la hambruna en Irlanda en 1845 al devastar los cultivos de papa. Incluso actualmente es una de las enfermedades mundiales más importantes. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad más los costos de producción para su manejo llegan a superar la cifra de 5 billones de dólares al año.

## D. NEMÁTODOS

De cerca de 17 órdenes de nemátodos que existen, únicamente dos son capaces de infectar plantas: Tylenchida y Drylaimida. Sin embargo, ellos pueden ocasionar grandes pérdidas en cultivos de importancia agrícola. El nemátodo *Ditylenchus dipsaci* es capaz de infectar cerca de 450 especies vegetales incluyendo árboles maderables. Las especies del género *Meloidogyne*, como *M. hapla*, atacan una gama de especies muy amplia que incluye algunas cultivadas como papa, zanahoria, fresas y cebolla. En algunos casos las enfermedades causadas por nemátodos pueden llegar a ocasionar la pérdida completa del cultivo. Otras especies como el nemátodo que produce quistes (*Heterodera glycines*) son más específicas y atacan soya solamente. Algunos nemátodos pueden ser

también vectores virales, por ejemplo *Tobacco rattle virus* que es transmitido por *Paratrichodorus anemones*, el cual causa severos daños a plantas ornamentales.

Las infecciones por nemátodos ocurren casi siempre en las raíces, donde producen cambios drásticos en su morfología; sin embargo, pueden ser tan drásticas que alteran el metabolismo entero de la planta.

#### BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (1997) *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, California.

Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.

Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Grissem and Jones Eds. Rockville.

Strange, R.N., Scott, P. R. (2005) Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol* 43: 83-116.

### III. MECANISMOS DE PENETRACIÓN, COLONIZACIÓN Y PROPAGACIÓN

Los estilos de vida y las características propias de cada microorganismo definen la vía por la cual estos son capaces de entrar a las plantas. Algunos microorganismos penetran directamente las capas superficiales de los tejidos vegetales a través de fuerzas mecánicas o de actividades enzimáticas. Otros atraviesan aperturas naturales (estomas o lenticelas), y un tercer grupo invade únicamente tejidos que han sido previamente sometidos a heridas. Un patógeno determinado puede emplear diferentes mecanismos de penetración, mientras que otros utilizan exclusivamente uno de ellos. Por ejemplo, el hongo *Botrytis* puede tener acceso a la planta, ya sea por penetración directa o por medio de heridas. Otros, como los mildews y royas, ingresan solamente a través de los estomas.

#### A. VIRUS

Los virus penetran a los tejidos vegetales principalmente por heridas causadas por los vectores que los transmiten, aunque algunos pueden entrar por heridas ocasionadas por instrumentos o herramientas humanas. De los virus que se transmiten por vectores, el 70% de ellos lo hacen mediante artrópodos, principalmente homópteros que se alimentan del floema. Un reducido número de virus es transmitido por nemátodos y algunos hongos. Dado que existe una estrecha especificidad entre el virus y su vector, el rango de plantas hospederas que pueden ser infectadas por un virus particular está determinado principalmente por la especificidad del vector sobre la planta, y no tanto por la capacidad del virus de replicarse en dicha planta. Según su estilo de vida dentro del vector, los virus pueden dividirse en persistentes o no persistentes. En el primer caso, los virus se ubican dentro de las cavidades bucales del insecto y lo abandonan una vez que se han alimentado. Los virus que se ubican en el intestino son semipersistentes, y aquellos que pasan del intestino y de la hemolinfa a las glándulas salivares son persistentes ya que son transmitidos permanentemente mientras el insecto esté vivo. Los virus persistentes suelen subdividirse en propagativos, en cuyo caso son capaces de replicarse tanto en el insecto vector como en la planta, y en circulativos que se replican únicamente en las plantas.

La “simplicidad” estructural de los virus hace que ellos requieran completamente los componentes y metabolitos de la célula hospedera para completar su ciclo de infección. Una vez que los virus penetran las células vegetales, la proteína de la cápside es removida durante un proceso llamado desensamblaje cotraduccional. Durante este proceso la molécula de ARN es rodeada por los ribosomas del hospedero, reemplazando la proteína de la cápside, lo cual permite la protección del ARN de la degradación por nucleasas. Los genes codificados

por los ácidos nucleicos virales son expresados, lo que permite la replicación viral y la producción de nuevas proteínas virales. Los genomas resultantes de la replicación son empaquetados para formar nuevas partículas ribonucleoproteicas que se propagan por toda la planta.

Antes de propagarse dentro de las plantas, los virus deben replicarse aprovechando la maquinaria de la célula huésped. Dado que los genes virales están codificados en un policistrón, al utilizar la maquinaria de la célula eucariótica, la traducción finalizaría al encontrar el primer codón de parada (STP) del gen que codifica para la primera proteína viral y los otros genes dentro del cistrón no serían traducidos. Una estrategia para solucionar dicho problema es producir ARNs subgenómicos. En este proceso, el primer cistrón que es traducido corresponde a la replicasa. La replicasa viral es capaz de generar secuencias subgenómicas a partir de la cadena de ARN viral original. Las secuencias subgenómicas corresponden a ARNs para cada uno de los genes que se encuentran después del primer cistrón. De esta manera se traducirán las otras proteínas funcionales, como la de movimiento y la de la cápside. Una estrategia alternativa que ha desarrollado otro grupo de virus es tener un genoma segmentado o multipartito. Por ejemplo, miembros de la familia *Bromoviridae* tienen tres ARNs genómicos empaquetados en partículas isométricas individuales, cada una de ellas con ARNs que codifican para cuatro proteínas. El ARN 1 codifica la proteína 1a que tiene las actividades metiltransferasa y helicasa. El ARN 2 codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Estas dos proteínas se localizan independientemente en el retículo endoplásmico de las células vegetales. El tercer ARN codifica para la proteína de movimiento y de la cápside. Una tercera estrategia que han desarrollado los virus (principalmente los *Potyviridae* y *Tymovirus*) es producir una sola poliproteína y partirla posteriormente a nivel postraduccional. Esta ruptura la realizan proteínas de los mismos virus. La replicación de los virus de ADN de cadena sencilla (*Geminiviridae*) ocurre dentro del núcleo de las células vegetales infectadas. La primera etapa es la replicación del ADN de cadena sencilla en la que se produce ADN de cadena doble empleando las enzimas del huésped. El mecanismo de replicación sigue el modelo del “círculo rodante”.

La propagación de los virus dentro de las plantas implica que ellos deben moverse desde el sitio inicial de la infección a las partes distales. Aunque existen unos pocos virus que viven dentro del xilema, la mayoría se introducen dentro de las células epidérmicas o del mesófilo de las hojas y deben encontrar la manera de llegar hasta el floema. El paso viral de una célula a otra dentro del floema recibe el nombre de *movimiento a corta distancia*, mientras que el desplazamiento del virus dentro del floema se conoce como *movimiento a larga distancia*. El movimiento a corta distancia implica la transferencia del virus entre las células de la epidermis y del mesófilo a las células del parénquima vascular y a las células acompañantes antes de entrar al floema. Todas

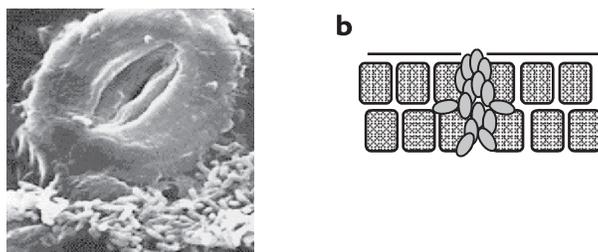
estas células poseen conexiones simplásticas conocidas como *plasmodesmos*, que son pequeños canales cilíndricos ubicados a lo largo de la pared celular. El tamaño normal de estos plasmodesmos no permitiría el paso de las partículas virales; en consecuencia, los virus poseen *proteínas de movimiento (MP)*, las cuales permiten el ensanchamiento de los plasmodesmos. En algunos virus solo existe un gen que codifica la proteína de movimiento, mientras que en otros existen tres posibles proteínas que cumplirían esta función. En algunos virus no se han identificado genes para la MP (*Potyvirus*). En estos casos el movimiento parece estar asociado con la proteína de la cápside o con las helicasas. Las MPs tienen la capacidad de unirse a los ácidos nucleicos del virus y además pueden interactuar con los microtúbulos y con los microfilamentos de actina del citoesqueleto de la célula huésped. De esta forma la MP incrementa el tamaño de los plasmodesmos y actúa como una proteína chaperona que permite el transporte del virus de una célula a otra. Aunque no se conoce en detalle el mecanismo en que la MP logra realizar su función, parece ser que este proceso está controlado por la fosforilación de ciertas proteínas kinasas. Cuando el virus ha entrado a la célula adyacente, la MP se acumula dentro del plasmodesmo y previene el paso de productos implicados en la respuesta antiviral.

Una vez que los virus han alcanzado los elementos de tubo criboso, se pueden mover junto con los compuestos producidos por la fotosíntesis. Las conexiones entre los elementos del tubo criboso (placa cribosa) son más anchas que los plasmodesmos, razón por la cual no parece haber una limitación física para el movimiento de los virus. Quizás el factor más importante durante este movimiento sea la protección de los ácidos nucleicos de la degradación por nucleasas, función que parecen cumplir las MPs y las proteínas de la cápside.

## **B. BACTERIAS**

En bacterias el inóculo está formado por entes individuales. En una gota de agua se pueden encontrar millones de bacterias individuales y es considerada como una fuente de inóculo. Las bacterias deben primero entrar en contacto y ser capaces de fijarse a la superficie de los órganos de las plantas. Los mecanismos y compuestos implicados en este contacto inicial aún no se han determinado con precisión. Las bacterias entran a las plantas básicamente a través de heridas, las cuales pueden ser recientes o antiguas y pueden estar formadas por tejido tanto lacerado como muerto. Las heridas se producen por diferentes factores, como el viento, la alimentación animal, las prácticas humanas (durante la plantación o la cosecha, por ejemplo), o por otros patógenos. Las bacterias que penetran por las heridas pueden presentar un crecimiento alrededor del tejido que conforma la herida, pero posteriormente invaden las células vegetales adyacentes. La penetración a través de heridas también ocurre en el caso de hongos y virus (a través de sus vectores). Las bacterias (y también ciertos hongos) pueden ingresar a través de aperturas naturales de los tejidos vegeta-

les, como estomas, lenticelas (aperturas presentes en los frutos y que permiten el paso del aire) e hidatodos (poros más o menos permanentemente abiertos ubicados en las márgenes o puntas de las hojas) (figura 2). En fecha reciente se estableció que los estomas son un punto activo de entrada de las bacterias y que la planta puede regular el cierre de ellos para evitar la infección en el interior de las hojas. En este trabajo se muestra que las bacterias, a través de la actividad de la coronatina (ver capítulo IV.B), son capaces de reabrir los estomas para colonizar los tejidos vegetales.



**Figura 2.** Mecanismo de penetración de bacterias. Las bacterias penetran usualmente a través de los estomas o a través de heridas. a. Microfotografía electrónica que muestra bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* penetrando a través de un estoma en células de yuca. b. Representación esquemática de la entrada y multiplicación de bacterias a nivel intercelular.

Las bacterias del suelo, como *A. tumefaciens* y *Ralstonia solanacearum*, entran a través de heridas que son percibidas muy posiblemente por ciertas señales químicas o exudados. La movilidad de estas bacterias está mediada por la presencia del flagelo.

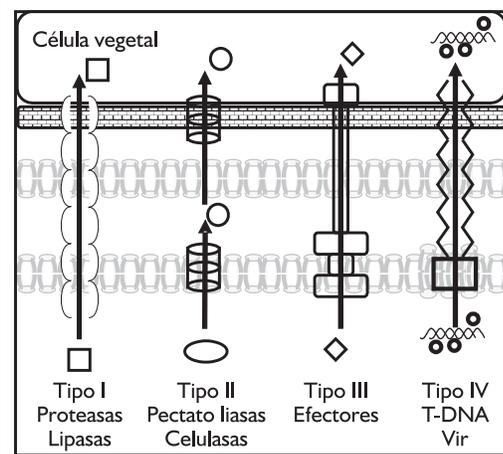
Bacterias necrotróficas, por ejemplo *Erwinia carotovora* y *E. chrysanthemi*, penetran empleando una batería de enzimas del tipo CWDEs (Cell-Wall Degrading Enzymes) que degradan la pared celular, como ocurre en ciertos hongos. A pesar de emplear la misma estrategia, la batería o coctel de enzimas que emplean estos patógenos difiere entre unos y otros. En el caso de *E. chrysanthemi* se producen varias pectinasas (pectin metil esterasas, pectato liasas, pectin liasas y poligalacturonasas), celulasas cuatro proteasas y una fosfolipasa. Las pectinasas se encuentran como isoenzimas (*PelA-PelE*)<sup>1</sup> y son particularmente importantes para iniciar la penetración y la infección. Mutaciones en genes individuales de *Pel* no producen una reducción importante en el poder patogénico, lo que sugiere una redundancia en función y una contribución parcial de cada una

<sup>1</sup> La nomenclatura para los genes es la siguiente: en mayúscula e itálica se designa a los genes (*RPS2*). En minúscula e itálica se representan los genes mutantes (*rps2*) y las proteínas se simbolizan por letras mayúsculas (*RPS2*).

de estas enzimas. Las CWDEs deben ser secretadas por las bacterias para que lleguen hasta las células vegetales. Para ello las bacterias emplean diferentes sistemas de secreción (BOX 2, Sistemas de secreción). Las proteasas presentan un péptido señal en su extremo C-terminal, lo que les permite ser secretadas a través del sistema de secreción tipo I; mientras que la mayoría de las pectinasas y celulasas son secretadas por el sistema de secreción tipo II.

### BOX 2 SISTEMAS DE SECRECIÓN

Las bacterias fitopatógenas deben secretar una serie de moléculas para poder tomar los nutrientes del interior de las células vegetales y crear un ambiente adecuado para su multiplicación. Las bacterias Gram-negativas emplean para ello diferentes vías de secreción. La complejidad de estas vías depende del número de proteínas implicadas en la formación de canales o poros. En estos canales o poros, que se forman entre las membranas interna y externa de las células bacterianas, los efectores se secretan desde el citosol al exterior de las células. Existen cuatro tipos básicos de sistemas de secreción. Los sistemas de secreción tipo I y II secretan proteínas al sobrenadante o a los espacios intercelulares del hospedero, mientras que los sistemas de secreción tipo III y IV liberan proteínas o ácidos nucleicos en el interior de las células del hospedero. La vía de secreción más simple es la I, la cual permite la liberación de proteínas del citoplasma al espacio extracelular. Ejemplos de proteínas efectoras secretadas vía este sistema son las proteasas y lipasas de la bacteria *Erwinia chrysanthemi*. El sistema de secreción II es más complejo, está formado por 12-16 proteínas y requiere dos pasos; en el primero, las proteínas se transportan al periplasma (espacio entre la membrana externa e interna de las células bacterianas); y posteriormente, en el segundo, la proteína atraviesa la membrana externa. El transporte al periplasma requiere la presencia de un péptido señal ubicado en la región N-terminal. Durante su paso por el periplasma, la proteína es procesada por una peptidasa señal; allí la proteína adopta el plegamiento correcto antes de ser secretada. Las proteínas implicadas en la degradación de la pared de las células vegetales, como la pectato liasa, las polygalacturonasas y celulasas de *Erwinia* y *Xanthomonas*, son ejemplos de proteínas secretadas a través de esta vía. Los sistemas de secreción tipo III y IV forman estructuras aún más complejas, similares a los flagelos y a las estructuras de conjugación, respectivamente. Los complejos proteicos implicados en estos sistemas de secreción interactúan directamente con las células del hospedero. El sistema de secreción tipo IV más estudiado es el de *Agrobacterium tumefaciens*, que es el único medio conocido a través del cual pueden pasar tanto proteínas como ácidos nucleicos al interior de las células vegetales.



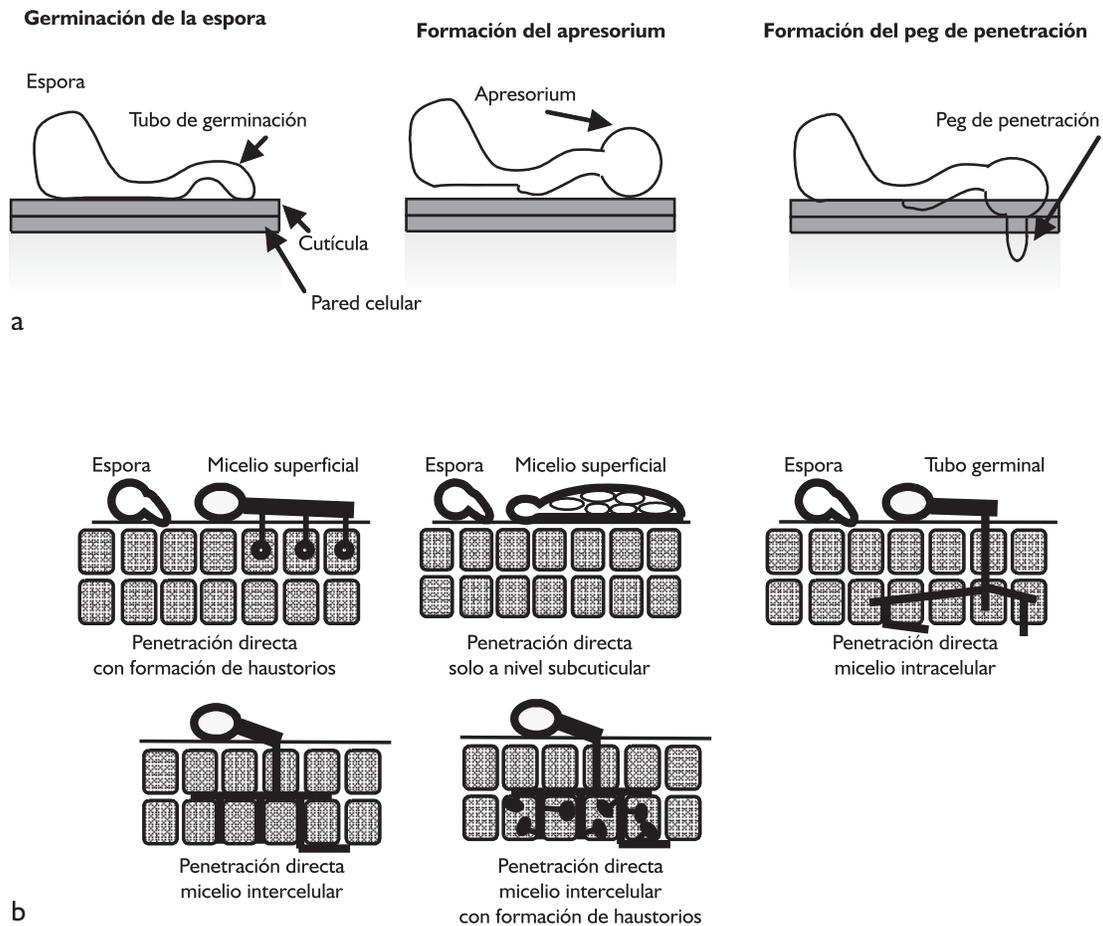
## C. HONGOS

En los hongos, el inóculo pueden ser las esporas, los esclerocios (una masa compacta de micelios) o los fragmentos de micelio. Las esporas de los hongos deben primero germinar, lo cual requiere condiciones ambientales favorables (como temperatura y humedad). Poco es lo que se conoce sobre cuáles son los factores que estimulan la germinación de las esporas, pero se cree que esta se ve favorecida por nutrientes que se difunden desde la superficie de la planta. Cuanto mayor sea la cantidad de nutrientes (azúcares y aminoácidos), habrá una mayor probabilidad de que un número más grande de esporas germine y de manera más rápida. En algunos casos la planta puede producir exudados que inhiben la germinación de las esporas de cierto grupo de hongos fitopatógenos o también pueden producir compuestos que favorecen su germinación. Cierta tipo de hongos son atraídos por compuestos producidos por las plantas. Es el caso de *Phytophthora sojae* que es atraído por los isoflavonoides daidzeína y genisteína producidos por las raíces de soya. Debe también existir una adhesión de la espora sobre la superficie de la planta, la cual se establece mediante interacciones hidrofóbicas de las esporas con la superficie cuticular de las células vegetales. Otros tipos de adhesión involucran la presencia de espinas sobre la superficie de las esporas (como el caso de las urediosporas producidas por algunos mildews), la liberación de compuestos metabólicos conocidos como adhesinas, o la producción de un mucílago como en *M. grisea*.

### I. PENETRACIÓN DIRECTA POR FUERZA MECÁNICA

Una vez que las esporas se han adherido y germinado en la superficie de las células vegetales, deben ser capaces de crecer dentro de la planta para obtener los nutrientes. Los hongos pueden tener acceso a las células vegetales de manera directa a través de la ruptura de la cutícula o crecer a través de aperturas naturales como los estomas o heridas. Sin embargo, la penetración directa es la vía más común de ingreso de los hongos. Las hifas penetran la rígida pared celular vegetal por medio de fuerzas mecánicas y en algunos casos emblandeciéndola enzimáticamente. La penetración no significa necesariamente una infección exitosa, ya que en ciertos casos los patógenos pueden morir antes de producir la enfermedad. Después de la germinación de la espora se produce un tubo germinal que constituye la primera parte del micelio. Muchos hongos forman un apresorium al final del tubo germinal. El apresorium es usualmente bulboso o cilíndrico con una superficie plana que entra en contacto con la superficie de la planta. Posteriormente se forma lo que se conoce como “peg de penetración”, el cual es una estructura que provoca invaginaciones de la membrana plasmática. Esta estructura de alimentación especializada incrementa el área superficial de contacto entre el hongo y la planta, maximizando el flujo de nutrientes y de agua, lo que favorece el crecimiento del hongo (figura 3a). En los últimos años se han caracterizado algunos genes implicados en la dife-

renciación del apresorium. Entre estos se encuentra el gen *PTH11*, identificado en *M. grisea*, el cual codifica una proteína transmembranal. Es posible que esta proteína actué como un receptor que percibe señales ambientales y, por analogía con sistemas animales, se ha especulado que conectados a estos receptores se podrían encontrar proteínas G heterotriméricas, las cuales permitirían la activación de una vía de señalización en la que participan proteínas quinasas dependientes de calcio o calmodulina.



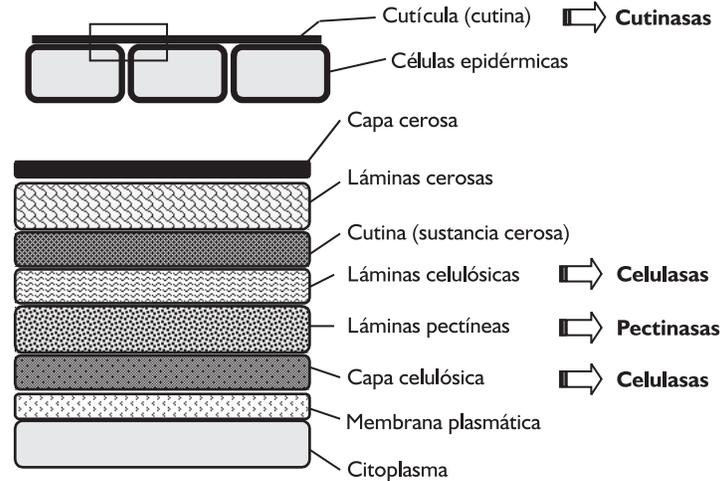
**Figura 3.** Mecanismos de penetración de hongos. a. Proceso de germinación, formación del apresorium y del peg de penetración durante la colonización de hongos. b. Diferentes formas de colonización de hongos. Crecimiento superficial, crecimiento intracelular, crecimiento intercelular sin y con formación de haustorios.

La penetración directa se realiza básicamente por fuerza mecánica, en la cual la estructura del apresorium juega un papel muy importante. Sin embargo, otro tipo de factores como la melanización, la producción de hidrofobinas y la turgencia, son también fundamentales para la entrada exitosa en las células

vegetales. La DHN-melanina es un pigmento fúngico oscuro producido por la polimerización de 1,8-dihidroxi-naftaleno. La función de la melanina en la pared celular del apresorium es retardar el eflujo de glicerol en el apresorium, lo que permite aumentar la turgencia hidrostática. Las hidrofobinas son pequeñas proteínas de 96-187 aminoácidos que contienen ocho residuos de cisteínas distribuidos en un patrón definido. Son secretadas por los hongos y sufren un proceso de polimerización en respuesta al aire o a superficies hidrofóbicas. Una vez polimerizadas, las hidrofobinas generan una superficie hidrofóbica que protege los hongos de la desecación. Uno de los genes de hidrofobinas más estudiados es el gen *MPG1* en *M. grisea*. Mutantes en este gen son incapaces de formar apresorios y, en consecuencia, no son infectivos, lo que demuestra la importancia de estas proteínas en la capacidad patogénica de los hongos. Se ha estimado que, aproximadamente a las 48 horas de la diferenciación del apresorium, los niveles de glicerol dentro de este pueden alcanzar una concentración de 3,2 M. Estas altas concentraciones de glicerol dentro del apresorium generan una presión de turgencia hidrostática que puede alcanzar valores de 8,7 MPa. Esta presión es empleada por el apresorium para generar una fuerza mecánica tal que le permite romper la cutícula de las células vegetales.

## 2. PENETRACIÓN DIRECTA POR ACCIÓN ENZIMÁTICA

Si bien la fuerza física juega el principal rol durante la penetración directa, algunos hongos, aunque no forman apresorios mecanizados, sí son, sin embargo, capaces de colonizar las células vegetales. La epidermis de las células vegetales está formada por una serie de compuestos que deben ser degradados para poder penetrar (figura 4; ver capítulo V.A). La degradación de cada una de las capas que constituyen la pared celular está mediada por la secreción de enzimas particulares producidas por algunos hongos y bacterias llamadas CWDE (Cell-Wall Degrading Enzymes). Las pectinasas son una de las primeras CWDE secretadas por los patógenos cuando entran en contacto con las plantas. Las principales pectinasas producidas por los hongos son endo y exopoligalacturonasas (PGs) y las pectato liasas (PLs), aunque también algunos hongos pueden secretar celulasas y cutinasas. Ciertos hongos pueden producir también pectin liasas, polimetilgalacturonasas, metilesterasas pécticas y ramno-galacturonasas. La mayoría de los genes que codifican pectinasas, celulasas y cutinasas se encuentran formando familias multigénicas (múltiples genes con la misma función), lo cual se traduce en una redundancia funcional. Así, por ejemplo, en *B. cinerea* existen cinco endo-PGs, y *Cochliobolus carbonum* y *M. grisea* poseen al menos cuatro xilanasas cada uno. Debido a esta redundancia, ha sido difícil lograr obtener mutantes para estos genes en los cuales se encuentre comprometido su fenotipo de patogenicidad.



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura de la pared celular y de las enzimas implicadas en su degradación presentes en algunos microorganismos fitopatógenos.

### 3. PROPAGACIÓN

En el caso de los hongos biotrofos existen diferentes estrategias para obtener los nutrientes de las células vegetales. En el apoplasto, las concentraciones de nutrientes (hexosas, sucrosa y aminoácidos) son muy bajas (milimolar), lo que no permite un rápido crecimiento. Algunos de ellos, como *C. fulvum*, son capaces de obtener los nutrientes a través de sus hifas de invasión que crecen en el apoplasto. Sin embargo, la mayoría forman estructuras especializadas conocidas como haustorios que les permiten incrementar la capacidad de adquisición de nutrientes al internarse en las células vegetales. El haustorio consiste típicamente en un tubo que se invagina dentro de la célula vegetal. El haustorio está rodeado por una pared fúngica modificada, una matriz extra-haustorial y una membrana extrahaustorial que se deriva de la membrana de la célula vegetal. Aunque no se conoce con certeza, se cree que es a través de estas estructuras que los nutrientes y ciertas señales pasan entre el patógeno y la célula vegetal.

Algunos hongos invaden las células vegetales produciendo un micelio que crece únicamente entre la cutícula y la epidermis (subcuticulares). Las royas y los mildews producen un micelio únicamente sobre la superficie de la planta pero envían haustorios al interior de las células epidérmicas. La mayoría de los hongos invaden los tejidos vegetales creciendo directamente dentro de las células y producen un micelio intracelular, o crecen entre las células y entonces producen un micelio intercelular (figura 3b). Aunque menos frecuentemente, ciertos hongos pueden invadir los vasos del xilema de las plantas. La amplia gama de estrategias que emplean los hongos para propagarse ha hecho que

los estudios bioquímicos y moleculares del proceso de señalización que tienen lugar se dificulten ostensiblemente.

#### **D. NEMÁTODOS**

En el caso de nemátodos, el inóculo puede ser nemátodos adultos, juveniles o huevos. Las condiciones para que los huevos de los nemátodos eclosionen son también particulares y dependen de la temperatura y humedad del suelo. Una vez los nemátodos están cerca de las raíces de las plantas, son atraídos por ciertos factores químicos asociados con el crecimiento radicular, principalmente dióxido de carbono y ciertos aminoácidos. Todos los nemátodos que afectan las plantas son biotrofos obligados. La penetración en los nemátodos es principalmente directa, la cual se da gracias a la actividad del estilete que ellos poseen. Los estiletos generan, mediante fuerza mecánica, un pequeño orificio en la pared celular por el cual el nemátodo puede penetrar a la célula vegetal. Los nemátodos ectoparásitos se alimentan exclusivamente en la superficie de la raíz, mientras que los endoparásitos invaden los tejidos radiculares y pasan un gran porcentaje de su vida en íntima asociación con las células radiculares. Durante la infección, los nemátodos endoparásitos en el estado juvenil migran hacia los tejidos vasculares; una vez allí, comienzan a tomar los nutrientes y pasan de un estado de vida móvil a uno sedentario. En este estado, los nemátodos, gracias al estilete, logran perforar la pared celular pero no la membrana de las células vegetales. La degradación de las membranas está determinada por la liberación de una serie de secreciones glandulares, las cuales inducen rápidos cambios en el citoplasma y la actividad metabólica de la célula se incrementa notoriamente. El nemátodo logra disolver las paredes celulares de varias células, de tal manera que las conexiones simplásticas entre células adyacentes se hacen más grandes y finalmente se produce la fusión de protoplastos. La consecuencia de estas perturbaciones permite la formación de las llamadas “estructuras de alimentación sincitiales” que implican alrededor de 200 células vegetales. Los nemátodos ectoparásitos inducen mitosis (sin citokinesis) y endorreplicación del ADN en las células corticales de la raíz de la planta, produciéndoles un crecimiento anormal, razón por la cual reciben el nombre de “células gigantes”. Las células gigantes son similares a las estructuras de alimentación sincitiales, en el sentido de que permiten la comunicación del nemátodo con el floema para poder así captar los nutrientes.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Agrios, G. (1997) *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, California.
- Deising, H. B., Werner, S., Wernitz, M. (2000) The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect* 2: 1631-41.

- Di, C., Zhang, M., Xu, S., Cheng, T. (2006) Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. *Crit Rev Microbiol.* 32: 91-100.
- Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Gruissem and Jones Eds. Rockville.
- Jha, G., Rajeshwari, R., Sonti, R. V. (2005) Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 891-8.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J., Govers, F. (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol.* 11: 462-9.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S. Y. (2006) Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Parniske, M. (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol.* 3: 320-8.
- Yu, J., Peñaloza-Vázquez, A., Chakrabarty, A. M., Bender, C. L. (1999) Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol.* 33: 712-20.

## IV. ARMAS QUÍMICAS DE LOS PATÓGENOS

Una vez se ha producido la penetración a las células, los hongos y algunos otros patógenos como bacterias secretan una serie de enzimas que ablandan o disuelven la pared celular haciendo más fácil la penetración subsiguiente y la colonización. La penetración directa llevada a cabo por fuerzas mecánicas juega un papel importante como punto de entrada, pero las actividades patogénicas posteriores son principalmente de naturaleza química. Los efectos causados por los patógenos sobre las plantas son casi en su totalidad el resultado de actividades bioquímicas que tienen lugar entre sustancias secretadas por el patógeno y aquellas presentes o inducidas en la planta. Las principales sustancias secretadas por los patógenos son enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento y polisacáridos.

### A. ENZIMAS

Dentro de las principales enzimas se encuentran las que son capaces de degradar las sustancias presentes en la pared celular. Muchos hongos producen cutinasas, las cuales tienen la capacidad de degradar la cutina, el componente principal de la cutícula. Producto de esta actividad enzimática se liberan monómeros y oligómeros de ácidos grasos derivados del polímero de cutina. La liberación de estos monómeros y oligómeros induce a su vez la expresión de los genes que codifican cutinasas produciendo un bucle de retroalimentación positiva. Las enzimas pectolíticas o pectinasas y otras CWDEs (ver capítulo III.C.2) producen la licuefacción del tejido vegetal y el ablandamiento de las paredes celulares. El fenómeno observado se conoce como maceración, el cual es típico de bacterias necrotróficas como *Erwinia*. Además de facilitar la invasión de los tejidos, las enzimas pécticas también proveen nutrientes al patógeno en los tejidos infectados. Existen varios tipos de celulasas (C1, C2, Cx y  $\beta$ -glucosidasa) las cuales degradan las cadenas de celulosa de manera secuencial, en cadenas más cortas hasta producir celobiosa, el sustrato de la  $\beta$ -glucosidasa que producirá monómeros de glucosa.

### B. TOXINAS

Algunos hongos necrotróficos producen unas toxinas que son activas solo en un rango estrecho de especies vegetales y se conocen como toxinas específicas (tabla 3). Cada toxina tiene un modo de acción altamente específico, de tal manera que es capaz de inactivar tan solo una enzima particular de una especie vegetal determinada. La toxina HC producida por *Cochliobus carbonum* inactiva la enzima histona deacetilasa que se requiere para activar los genes de defensa. El hongo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* produce la toxina AAL la cual parece activar la muerte celular programada en plantas de tomate. Entre las

toxinas mejor caracterizadas se encuentran las producidas por *Cochliobolus*: la toxina T y la victorina-C. La toxina T es producida por *C. heterostrophus*, la cual ocasionó la epidemia en Norteamérica en 1970. La raza T del hongo responsable de esta epidemia contiene dos genes que se requieren para la biosíntesis de la toxina: una poliketido sintasa (*PKS1*) y una decarboxilasa (*DEC1*). Otras cepas presentes antes de la epidemia (por ejemplo, la raza O) no poseen ninguno de estos genes y son menos patogénicas. La actividad de esta toxina impide la síntesis de ATP en las células vegetales, de tal manera que la producción de energía se bloquea y la planta no es capaz de activar las respuestas de defensa. La toxina victorina es producida por *C. victoriae* que infecta específicamente plantas de avena. La toxina inhibe la función mitocondrial, por lo cual las plantas son incapaces de realizar los procesos de fotorrespiración y, en consecuencia, las hojas presentan un fenotipo de senescencia inducida.

**Tabla 3.** Ejemplos de algunas toxinas específicas.

Toxina	Microorganismo	Planta hospedero
HC	<i>Cochliobolus</i> , Raza I <i>Helminthosporium carbonum</i>	Maíz
HS	<i>H. sacchari</i>	Caña de azúcar
ACL	<i>Alternaria citri</i> (raza limón)	Limón agrio
ACT	<i>A. citri</i> (raza tangerina)	Tangerina dancy
AL	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate
AF	<i>Alternaria</i> sp.	Fresa-peral japonés
AT	<i>Alternaria</i> sp.	Tabaco
CC	<i>Corynespora cassiicola</i>	Tomate
	<i>Hypoxyton mammatum</i>	Álamo
	<i>Perenophora teres</i>	Cebada
PM	<i>Phyllosticta maydis</i>	Maíz
PC	<i>Pericornia circinata</i>	Sorgo

Existe otro tipo de toxinas llamadas no selectivas (tabla 4) las cuales pueden causar daños tanto a plantas hospederas como a plantas que normalmente no son atacadas por el patógeno que las produce. La fusicoccina es producida por *Fusicoccum amygdali* la cual se dirige contra las ATPasas localizadas en las membranas celulares de muchas especies vegetales. La unión de esta toxina hace que los estomas se abran de manera irreversible produciendo el marchitamiento, la muerte celular y, finalmente, la colonización necrotrófica del hongo. Toxinas de tipo perilenequinona son producidas por patógenos como *Cladosporium* spp. y *A. alternata*. Estas toxinas son pigmentos fotodinámicamente activos que inducen la peroxidación de lípidos vegetales.

**Tabla 4.** Ejemplos de algunas toxinas de amplio espectro.

Toxina	Microorganismo	Planta hospedero
Ácido fumárico	<i>Rhizopus</i> sp.	Almendro
Ácido oxálico	<i>Sclerotium</i> sp. <i>endothia parasitica</i>	Castaño
Ceratoulmina	<i>Ceratocystis ulmi</i>	Olmo holandés
Ofiobolinas	<i>Helminthosporium</i> sp.	Cereales
Pircularina	<i>Pyricularia oryzae</i>	Arroz
Cercosporina	<i>Cercospora</i> sp.	Remolacha
Ácido fusárico y licomarasmina	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate
Coronatina	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i>	Arabidopsis
Rizobitoxina	<i>Rhizobium japonicum</i>	Soya
Siringomicina	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Tomate
Siringotoxina	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Cítricos

Las toxinas son especialmente importantes en bacterias, en particular las pertenecientes al género *Pseudomonas*. Las toxinas bacterianas, si bien no son indispensables para la patogenicidad, inducen clorosis e incrementan la severidad de la enfermedad. Las toxinas más estudiadas en bacterias son la coronatina, la tabtoxina, la syringomicina y la syringopeptina. La coronatina es producida por una amplia gama de patovares de *Pseudomonas* que son capaces de infectar plantas de soya, crucíferas y tomate, entre otras. Los genes responsables de la biosíntesis han sido identificados dentro de un *cluster* que cubre una región de 32 kb en el plásmido de *P. syringae* pv. *glycinea*. La coronatina tiene similitudes estructurales y funcionales con metil jasmonato (MeJA), el cual es una molécula señal importante producida por plantas superiores (ver capítulo XI). Se ha sugerido que la función de la coronatina es suprimir la inducción de los genes PR (Pathogenesis Related) de las plantas, permitiendo así una mayor multiplicación del patógeno (ver capítulo VIII.B.6). La tabtoxina es un  $\beta$ -lactamo monocíclico que, por ruptura a través de una aminopeptidasa, genera la tabtoxina  $-\beta$ -lactamo la cual es responsable de la toxicidad. Los genes de la biosíntesis de la tabtoxina también se encuentran formando un *cluster* dentro del genoma. La región donde estos genes se encuentran presenta bastante inestabilidad, liberándose con alta frecuencia del genoma y generando así cepas que no son capaces de producir esta toxina. La syringomicina y la syringopeptina son producidas por los patovares *P. syringae* pv. *syringae*. Son fitotoxinas lipopeptídicas que causan síntomas necróticos en las plantas que infectan. Estas toxinas generan poros en las membranas plasmáticas, lo que produce un influjo de iones y lisis celular. Los genes de la ruta biosintética de estas toxinas están ubicados adyacentemente uno del otro en una isla de patogenicidad.

## C. HORMONAS

Las hormonas juegan también un papel importante en la capacidad de colonización de ciertas bacterias, especialmente en aquellas que producen una proliferación descontrolada del tejido vegetal o lo que se conoce con el nombre de agallas. Dentro de estas bacterias encontramos *P. syringae* pv. *savastanoi*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Pantoea herbicola* pv. *gysophilae*, entre otras. En estas bacterias, la producción de la auxina ácido indol 3-acético (IAA) es importante para la patogénesis. Las bacterias emplean una síntesis de IAA poco empleada por las plantas (a partir de triptófano por la vía indolacetamida -IAM-) y se cree que es a través de esta vía que las bacterias incrementan las concentraciones de IAA de manera descontrolada, lo que provoca la proliferación desordenada de las células vegetales. Los genes responsables de esta vía pueden estar ubicados tanto en el genoma como en *P. syringae* pv. *savastanoi*, o en los plásmidos como es el caso de *P. herbicola* pv. *gysophilae*.

## D. POLISACÁRIDOS

Para muchas bacterias, especialmente *R. solanacearum*, *X. campestris*, *P. stewartii* y *E. amylovora*, la producción de polisacáridos extracelulares (EPSs) juega un papel importante en su poder patogénico. Los EPSs consisten en una mezcla de azúcares dispuestos en un patrón específico de unidades repetidas. Por ejemplo, el EPS I de *R. solanacearum* consiste en un polímero de 106 Da con la unidad trimérica N-acetyl galactosamina, ácido 2-N-acetyl-2-deoxy-L-galacturónico y 2-N-acetyl-4-N-(3-hidroxitbutanoyl)-2-4-6trideoxy-D-glucosa.

Los EPSs protegen a las bacterias de la desecación en las superficies de las hojas o en la rizosfera. También pueden cumplir una función de protección contra compuestos vegetales tóxicos o frente a las defensas inducidas por las plantas. La acumulación de EPSs en las plantas produce grandes lesiones y el bloqueo del xilema, lo que lleva finalmente al marchitamiento de la planta.

Son varios los genes implicados en la biosíntesis y transporte de EPSs a la superficie de las células. En *Ralstonia*, cuando la bacteria alcanza una alta densidad poblacional en el xilema (*quorum sensing*) se expresa el gen *PhcA*, que es un regulador de la expresión de varios genes implicados en la biosíntesis de EPSs. Varios de los genes de la biosíntesis de EPSs se encuentran en *clusters* dentro del genoma. En *P. stewartii* y en *E. amylovora*, los genes que producen ciertos tipos de EPSs se encuentran también en *clusters* y acompañados de genes que codifican proteínas con actividad de transporte de azúcares, transferasas de lípidos y genes del sistema de transporte ABC. *X. campestris* pv. *campestris* produce un EPS conocido como goma de xanthano, el cual se emplea comercialmente en la industria de alimentos. Los genes para la biosíntesis y transporte de xanthano son doce y se conocen como *gumB* a *gumM*. Bacterias mutantes en las

cuales está bloqueada la biosíntesis de xanthano presentan una patogenicidad reducida y las plantas infectadas con estos mutantes presentan menor número de lesiones. La producción de lipopolisacáridos (LPSs) es también importante para el poder patogénico en *Ralstonia* y *Xanthomonas*. Bacterias incapaces de producir LPSs son incapaces de sobrevivir en las plantas.

## E. DETOXIFICADORES

Durante las respuestas de defensa, las plantas producen una serie de compuestos antimicrobianos tóxicos (ver capítulo V.A). Los patógenos, para tener acceso a los nutrientes, deben ser capaces de detoxificar las sustancias tóxicas producidas por las plantas. Algunos hongos producen enzimas que degradan estos compuestos antimicrobianos. La tomatinasa es producida por hongos, la cual parece tener una función dual. Por un lado, detoxifica las fitoanticipinas producidas por las plantas a través de hidrólisis enzimáticas y, por otro, los productos de la degradación de fitoanticipinas inducen una serie de transducción de señales en las plantas que culmina con la supresión de las respuestas de defensa vegetales. La pisatina es una fitoalexina de tipo isoflavonoide producida por plantas de arveja. La enzima pisatina demetilasa (*pda/cyp57*) es producida por patógenos que son capaces de detoxificar este compuesto. Esta enzima es una citocromo P450 mono-oxigenasa, la cual es un tipo de enzima presente en muchos organismos y está implicada en reacciones degradativas y biosintéticas. Patógenos que normalmente son incapaces de detoxificar la pisatina, al introducirles el gen *Pda1* fueron capaces de degradar la pisatina, pero esto no se correlacionó con la capacidad de infección en arvejas, lo cual demuestra que existen otros factores de patogenicidad implicados.

Otra vía que pueden emplear los patógenos para detoxificar los compuestos antimicrobianos producidos por las plantas es transportarlos al exterior de sus células. La principal clase de transportadores que cumplen esta función son los *ATP-binding cassette* (ABC transportadores). Este tipo de transportadores ha sido identificado en varios tipos de patógenos y en algunos de ellos se ha establecido que la mutación en estos genes ocasiona la pérdida de su capacidad patogénica. De manera interesante, este tipo de genes es también inducido en presencia de ciertos fungicidas, lo que sugiere que los hongos pueden utilizar los transportadores ABC para exportar fungicidas u otros compuestos tóxicos y así generar una resistencia a estos productos químicos.

Los patógenos también pueden emplear una amplia gama de estrategias para suprimir o bloquear las respuestas de defensa de las plantas (ver capítulo VIII. B.6). Por ejemplo, el hongo *Mycosphaerella pinoides* produce una serie de glicopéptidos llamados suprescinas, que generan un retardo en la producción de proteínas PR (ver capítulo X.B.9), como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona sintasa (CHS) que son normalmente inducidas como respuesta al

ataque de patógenos. Otra de las estrategias que emplean las plantas para defenderse es la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS). Los patógenos, a través de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa, logran “secuestrar” los ROS producidos por las células vegetales, haciéndolos poco nocivos para los patógenos. Los virus también poseen genes que les permiten suprimir las respuestas de defensa de las plantas. Uno de los mecanismos empleados por las plantas para defenderse del ataque viral es el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, ver capítulo XIII). Los virus han desarrollado estrategias que les permiten suprimir el PTGS (ver capítulo XIII.F).

#### BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1997) *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, California.
- Daub, M. E., Herrero, S., Chung, K. R. (2005) Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiol Lett.* 252: 197-206.
- Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Grissem and Jones Eds. Rockville.
- Kao, C. C., Sequeira, L. (1991) A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol.* 173: 7841-7.
- Kimura, M., Anzai, H., Yamaguchi, I. (2001) Microbial toxins in plant-pathogen interactions: Biosynthesis, resistance mechanisms, and significance. *J Gen Appl Microbiol.* 47: 149-160.
- Marín-Rodríguez, M. C., Orchard, J., Seymour, G. B. (2002) Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot.* 53: 2115-9.

## LOS PROTAGONISTAS: LAS PLANTAS

### V. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LAS PLANTAS

*“Tal vez con los minutos la memoria procede como el cuerpo frente a las invasiones de los microbios. Apenas se produce la invasión, saltan inmediatamente al contraataque millones, miles de millones de glóbulos amigos y se amontonan en torno al punto crucial, lo aíslan, lo sumergen, espesan los tejidos hasta crearles en torno una costra de cal invencible. Debo haber leído acerca de pulmones en los que, encapsulado, un foco resiste, muere, renace, prácticamente eterno y prácticamente impotente, dentro de la muralla china que lo ciñe. Igual con los recuerdos, digo. Una fuerza defensiva aísla los más peligrosos y los deja desarmados durmiendo dentro de nosotros. Inactivos pero vivos. Inmortales pero inertes”.*

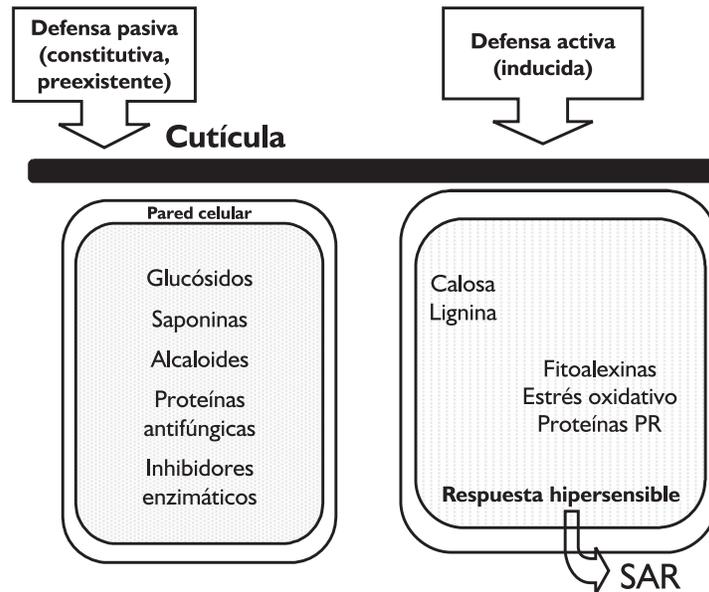
Gesualdo Bufalino. *Argos el ciego*.

Las plantas están sometidas permanentemente al contacto con diferentes tipos de microorganismos como virus, bacterias, hongos y nemátodos. Sin embargo, solo una relativa pequeña proporción de ellos ocasionan enfermedades en las plantas. Las condiciones ambientales, el carácter patogénico de los microorganismos y las propiedades de resistencia-susceptibilidad de las plantas definen la capacidad o no del microorganismo para invadir la planta y ocasionar enfermedad. La presencia y las características de estos tres elementos, actuando de manera concertada, definirán si la planta desarrollará la enfermedad o será capaz de detener el crecimiento y la colonización del patógeno.

Así como los patógenos han evolucionado y desarrollado mecanismos para poder colonizar y completar sus ciclos de vida dentro de las plantas, estas a su vez han desarrollado mecanismos que previenen, detienen o toleran la presencia de estos microorganismos en su interior. Las plantas no poseen un sistema circulatorio o inmunitario especializado que les permita reconocer y defenderse de los patógenos, como sí ocurre en los mamíferos. Cada célula vegetal tiene la capacidad de reconocer un microorganismo intruso y desarrollar estrategias que le permiten detener su colonización y multiplicación. A diferencia de lo que intuitivamente se podría pensar, la mayoría de las plantas son capaces de defenderse del ataque de los patógenos. La enfermedad es considerada más la excepción que la regla en las interacciones planta-patógeno. Solamente un reducido número y tipo de microorganismos es capaz de evadir las respuestas de defensa de las plantas.

Los mecanismos de resistencia de las plantas pueden subdividirse en dos categorías: pasivos (constitutivos) y activos (inducidos) (figura 5). Los mecanismos pasivos implican barreras estructurales como la cutícula y otros tipos

de compuestos químicos antimicrobianos preformados llamados fitoanticipinas. Si estas barreras estructurales preformadas son superadas por los patógenos, entonces la planta puede activar otros mecanismos de defensa, que incluyen la respuesta hipersensible (RH) y la activación de varios genes de defensa.



**Figura 5.** Representación esquemática de los mecanismos de resistencia constitutivos e inducidos que emplean las plantas.

## A. DEFENSAS CONSTITUTIVAS

La primera barrera estructural que deben superar los patógenos para iniciar una infección es la degradación de la pared celular vegetal. Como se puede observar en la figura 4, la pared celular consiste en una serie de capas, cada una con una composición química particular. En la cutícula se encuentra una capa de ceras que forma una estructura repelente que previene la formación de gotas de agua necesarias para el ingreso de las bacterias y la germinación de las esporas de hongos. La cutina, la celulosa y la pectina presentes en la cutícula forman una barrera que evita la penetración de los microorganismos.

Las sustancias pécticas constituyen el principal componente de la lámela media que actúa como un cemento intercelular. Las sustancias pécticas también constituyen un elemento primordial de la pared celular primaria de las células vegetales. Las sustancias pécticas son polisacáridos formados principalmente por cadenas de galacturonano intercaladas con algunas moléculas de rhamnosa y con pequeñas cadenas laterales compuestas principalmente de azúcares de cinco carbonos.

Las puntas radiculares que están en continuo crecimiento en búsqueda de nutrientes y agua presentan unas paredes y membranas menos rigurosas y constituyen un punto de infección más factible para patógenos del suelo. Las plantas han generado un mecanismo de protección en el cual un importante número de células se desprende y rodea las células de las puntas radiculares; son las llamadas “células borde”. Además de este mecanismo de protección, las raíces también producen un mucílago que repele las bacterias.

Dentro de las sustancias químicas presentes en las plantas antes de la infección y que pueden tener una función de resistencia se encuentran varios compuestos fenólicos, taninos y algunos ácidos grasos como los dienos. Muchos de estos compuestos son potentes inhibidores de muchas enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran las CWDEs producidas por algunos patógenos. Otros compuestos químicos, como las saponinas (compuestos triterpenoides o esteroides glicosilados), dentro de las cuales se encuentran la tomatina y la avenacina, tienen una actividad antifúngica y además repelen patógenos fúngicos que no posean saponinasas. Las fitoanticipinas y las fitoalexinas constituyen otras barreras químicas producidas por las plantas, las cuales inhiben el crecimiento de los patógenos. La diferencia entre ellas radica en que las primeras son producidas de manera constitutiva, mientras que las segundas son sintetizadas o producidas inmediatamente después de que la infección ha ocurrido. Sin embargo, esta distinción puede ser contradictoria pues en algunas especies ciertos compuestos son constitutivos mientras que en otras son inducidos. La naturaleza y la función de este tipo de compuestos se discutirán en el capítulo X.B.8.

## **B. MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS**

Debido a que los mecanismos de defensa inducidos se desencadenan una vez que ha ocurrido el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, se discutirán en el capítulo X.B.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Wittstock, U., Gershenzon, J. (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 300-7.

## **VI. LA RESISTENCIA**

En aquellos casos en que una planta es capaz de activar los mecanismos de defensa y consigue impedir o frenar la colonización de un patógeno, se define la planta como resistente, y la interacción que se establece con el patógeno es de tipo incompatible. Si, por el contrario, las defensas de la planta no son inducidas o lo son de manera ineficaz, entonces el patógeno es capaz de multiplicarse e infectar la planta completamente; en este caso la planta es susceptible y se trata de una interacción compatible. En algunas circunstancias se ha empleado el concepto de tolerancia. En dicho caso, el crecimiento del patógeno no es frenado por la planta; sin embargo, los desgastes en términos de rendimiento causados por el patógeno son reducidos o escasos. Los mecanismos moleculares subyacentes a la tolerancia son poco conocidos, ya que las diferencias en términos de tolerancia entre diferentes genotipos son difíciles de establecer y, por consiguiente, de estudiar.

Clásicamente se han definido diferentes tipos de resistencia: cuantitativa, cualitativa y no hospedero.

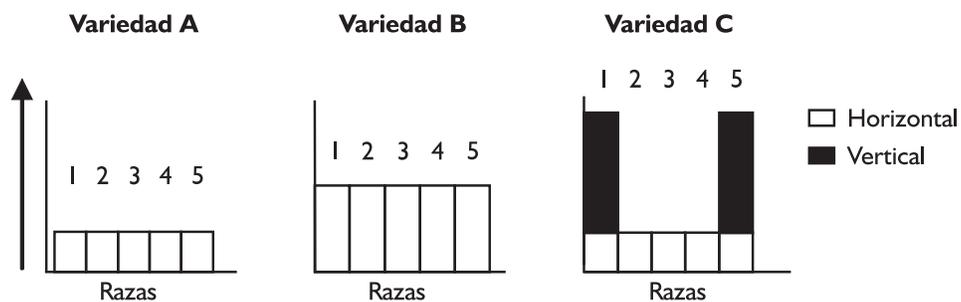
### **A. RESISTENCIA CUANTITATIVA**

La resistencia cuantitativa también ha sido definida como horizontal o no específica. Se caracteriza por presentar una variación continua del nivel de resistencia entre los individuos de una colección o una descendencia. En la mayoría de los casos no se ha observado una RH clara; aunque este no es el factor determinante para definirla. La resistencia cuantitativa es controlada por varios o pocos genes, por lo que se dice que es oligo o poligénica. Cada uno de estos genes contribuye de manera parcial y aditiva a la resistencia. Los varios genes implicados parecen ejercer su influencia controlando múltiples pasos de los procesos fisiológicos y bioquímicos que proveen a la planta los materiales y las estructuras que logran detener la multiplicación y colonización del patógeno.

La resistencia cuantitativa u horizontal es afectada considerablemente por las condiciones ambientales, lo que no ocurre con la resistencia de tipo cualitativo. Generalmente la resistencia horizontal no protege a las plantas de una infección, pero sí logra reducir el avance de focos de infección y de esta forma reduce la expansión y desarrollo de la enfermedad. En los últimos años se ha postulado la hipótesis de que algunos de los genes individuales que contribuyen a la resistencia cuantitativa pueden poseer la misma estructura que los genes de la resistencia cualitativa (ver capítulo VII.I). Se considera que este tipo de resistencia es de amplio espectro (la misma variedad de planta puede ser resistente a una amplia gama de cepas de una especie de un patógeno determinado) y que es durable en el tiempo (figura 6). Dado que son varios los genes responsables de la resistencia, es más difícil para el patógeno acumular mutaciones

favorables de manera simultánea en varios genes para romper la resistencia de la planta.

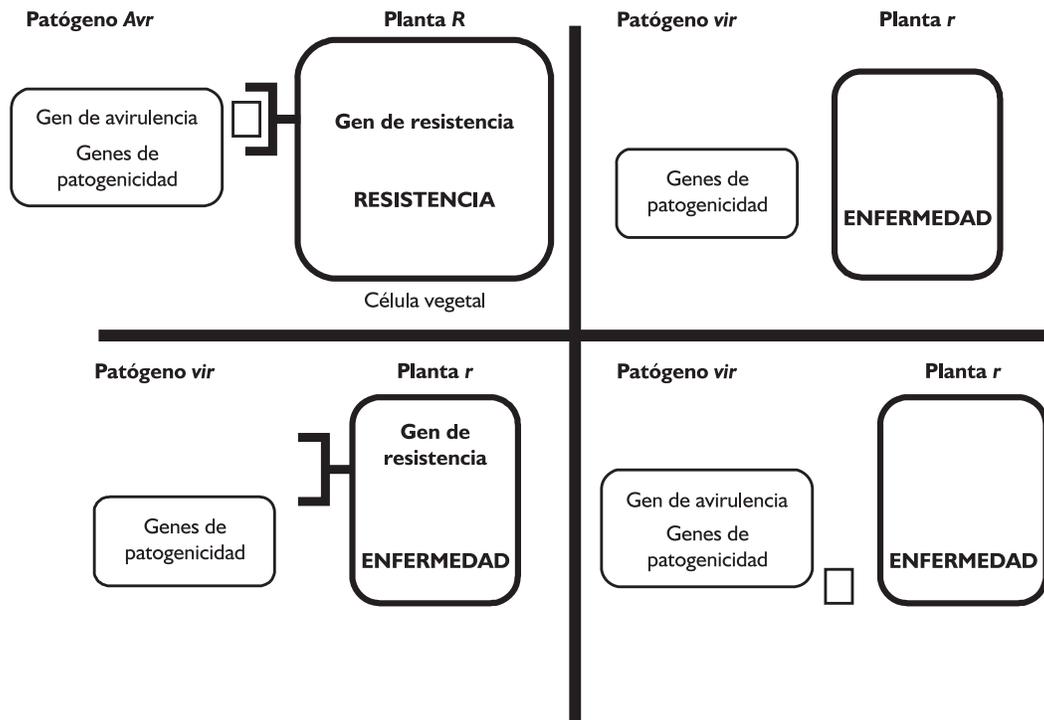
El mecanismo para el estudio de la resistencia cuantitativa es el mapeo e identificación de QTL (Quantitative Trait Loci). En este tipo de metodología se busca establecer si existe correlación entre los marcadores moleculares presentes en un mapa genético y el fenotipo de una característica de variación continua en evaluación. Para el análisis de QTLs se requiere una población de mapeo segregante, en la cual los dos parentales presentan características contrastantes. Esta población segregante puede ser una F2, líneas recombinantes (Recombinant Inbred Lines, RILs), retrocruces o dobles haploides. La elección de la población segregante estará determinada por la genética y la facilidad de obtención en la especie vegetal bajo estudio. Se debe contar igualmente con un mapa de ligamiento con un buen número de marcadores moleculares. Empleando tales poblaciones de mapeo en combinación con el mapa de ligamiento, es posible evaluar fenotípicamente la característica de interés (en este caso la resistencia) y desarrollar un análisis estadístico de ligamiento que permita localizar los QTLs implicados en la característica. Las regiones genómicas implicadas en la resistencia se identifican usualmente mediante análisis de regresión o por mapeo por intervalo. Dado que el análisis de QTL se basa en un cálculo estadístico, es difícil determinar la localización precisa de un QTL individual aunque se empleen poblaciones segregantes muy grandes y un alto número de marcadores moleculares. La identificación de un QTL corresponde a una región genómica que puede abarcar decenas o incluso cientos de genes. La mayor dificultad es la identificación del o de los genes dentro del QTL responsables del fenotipo. Se han desarrollado varias estrategias que han permitido la clonación de varios genes a partir de QTLs; sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado el primer gen de resistencia asociado a un QTL. El número de QTLs detectados para la resistencia varía entre diferentes especies vegetales y puede oscilar entre 2 y 11; cada uno contribuye de manera diferente (entre 14% y 82%) a la varianza fenotípica.



**Figura 6.** Resistencia cuantitativa (oligo o poligénica) y cualitativa (monogénica). La resistencia cuantitativa presenta un relativo bajo nivel de resistencia a un amplio espectro de cepas de un patógeno, mientras que en la resistencia cualitativa son solo unas pocas variedades las que muestran un alto nivel de resistencia pero frente a razas o cepas específicas de un patógeno determinado.

## B. RESISTENCIA CUALITATIVA

La resistencia cualitativa es aquella que está determinada por un gen mayor (figura 6). Clásicamente, esta resistencia corresponde al modelo gen por gen establecido por Flor en los años cincuenta cuando estudiaba la interacción entre el lino y el mildew del lino (*Melampsora lini*). A través de estudios genéticos, Flor demostró que variedades particulares de lino eran resistentes a cepas específicas del hongo. Flor planteó entonces que la resistencia estaba condicionada por la presencia de un gen de resistencia (*R*) (de carácter dominante) en la planta, al cual le correspondía un gen de avirulencia (*Avr*) (también dominante) presente en el patógeno. Cada gen de resistencia y de avirulencia puede poseer varios alelos recesivos. Toda interacción que implique alelos recesivos conducirá a la enfermedad o una interacción compatible (figura 7). Más adelante se presentarán las bases moleculares del modelo gen por gen.



**Figura 7.** Modelo gen por gen propuesto por Flor. La resistencia (reacción incompatible) se manifiesta cuando los genes dominantes complementarios están presentes en la planta (*R*) y en el patógeno (*Avr*). Una alteración o la ausencia de los correspondientes genes (transformación del gen *R* a *r*) en la planta o en el patógeno (el gen *Avr* se transforma en *avr*) conduce a la susceptibilidad o reacción compatible.

La resistencia cualitativa también se conoce como raza específica, pues solo unas variedades particulares de plantas (aquellas que contienen los genes *R* co-

rrispondientes a los genes *Avr*) serán resistentes a las cepas de una especie de patógeno particular que contenga el gen de avirulencia correspondiente. Cada gen *R*, por ejemplo *R2*, hará que las plantas sean resistentes a todas las razas de patógenos que contengan el gen de avirulencia correspondiente; en este caso, *Avr2*. Las plantas que carezcan del gen *R2* podrán ser infectadas con éxito por todas las cepas del patógeno que contengan el gen *Avr2*. Se considera que este tipo de resistencia no es durable en el tiempo, ya que cepas de patógenos que posean los genes *Avr* que son reconocidos por los genes *R* presentes en una población de plantas pueden mutar y la resistencia se perdería. Una sola mutación en el gen de *Avr* correspondiente bastaría para que el patógeno se vuelva virulento. Una resistencia completa podría obtenerse si se combina simultáneamente más de un gen *R* (piramidaje de genes). De esta forma resultaría más complicado para un patógeno mutar varios genes *Avr* simultáneamente para romper la resistencia.

### **C. RESISTENCIA NO HOSPEDERO**

La mayoría de plantas son resistentes a un número importante de patógenos. La resistencia que presentan todos los individuos dentro de una especie a todos los aislamientos, razas o cepas de un tipo particular de patógeno es considerada como resistencia no hospedero y es expresada por cada planta a la mayoría de patógenos que ella puede encontrar. Esto explica por qué la mayoría de patógenos aislados de una especie vegetal son incapaces de infectar, reproducirse y causar enfermedad en otra especie vegetal distantemente relacionada. Los microorganismos potencialmente fitopatogénicos incapaces de infectar cualquier cultivar de una especie vegetal se llaman patógenos heterólogos; mientras que las plantas resistentes a todos estos aislamientos se denominan plantas no hospederas. Se considera entonces como una interacción heteróloga o incompatibilidad básica. La resistencia no hospedero está determinada por varios niveles de defensa que incluyen tanto barreras constitutivas (que se describieron precedentemente) como reacciones inducibles (que se presentarán más adelante). A pesar de que la resistencia no hospedero es la que se presenta más frecuentemente en la naturaleza, por mucho tiempo no fue muy estudiada. Sin embargo, en los últimos años ha cobrado un interés mayor y los trabajos recientes han permitido dilucidar los mecanismos y los genes implicados. Una de las sorpresas que estos estudios han permitido develar es que muchos de los mecanismos subyacentes a la resistencia no hospedero presentan una similitud importante con los que se activan durante la respuesta inmune en mamíferos e insectos. Estas observaciones han llevado a sugerir procesos de convergencia evolutiva o un origen ancestral común de la resistencia en los seres vivos. Sin embargo, este tipo de hipótesis está aún en permanente debate.

La resistencia no hospedero implica la activación de una respuesta de defensa que ha sido denominada defensa basal. Las defensas basales son induci-

das por microorganismos no patógenos, por bacterias mutadas en el T3SS (ver capítulo VIII.B.1), por bacterias muertas por calor y por factores denominados PAMPs o MAMPs (ver capítulo VII). Estos factores se conocen como elicitores generales y representan moléculas que se hallan en la mayoría de microbios como lipopolisacáridos, flagelina o proteínas de choque térmico. La resistencia basal se manifiesta como la formación de papilas ricas en calosa, producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) y un incremento en la expresión de genes de la vía de fenilpropanoides y otros genes asociados con la defensa como *PR* (ver capítulo X.B).

#### BIBLIOGRAFÍA

- Flor, H. H. (1955) Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
- Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-91.
- Hammond-Kosack, K. E., Parker, J. E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* 14: 177-93.
- Young, N. D. (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol.* 34: 479-501.

## PRIMER ACTO: EL RECONOCIMIENTO

### VII. LOS GENES *R*

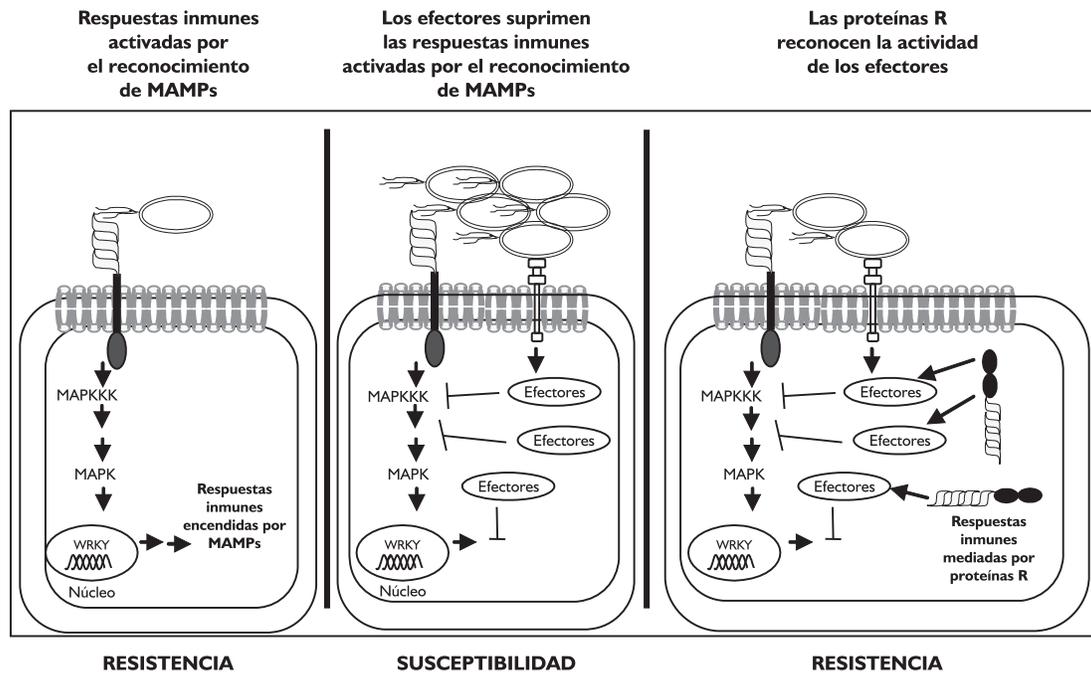
Resulta evidente pensar que a lo largo de la historia evolutiva las plantas han establecido interacciones moleculares con diferentes tipos de microorganismos, ya sean patogénicos, endófitos, simbióticos o epifíticos. Estas interacciones han moldeado de manera importante las características de las plantas y su capacidad de conquistar el ambiente terrestre.

La capacidad de discriminar entre algo propio y algo extraño es una característica importante de todos los seres vivos y constituye la base de la activación de los mecanismos de defensa innata contra todo tipo de infección por microorganismos. La base molecular que subyace a esta propiedad discriminatoria está en la capacidad de reconocimiento de componentes del patógeno que son percibidos como elementos extraños. Una vez se ha establecido este reconocimiento, se desencadena una subsiguiente activación de respuestas de defensa que conducen a limitar la multiplicación y expansión del microorganismo.

Una vez que los patógenos logran penetrar la pared celular, son percibidos por receptores presentes en las células vegetales. Los receptores actúan entonces como centinelas que vigilan la posible invasión microbiana.

La inmunidad en plantas consiste en un complejo sistema de vigilancia que detecta varias moléculas asociadas con la infección y que permiten iniciar las respuestas de defensa. Dentro del sistema inmune vegetal podemos definir dos ramas, que responden a dos clases de moléculas generadas por los patógenos (figura 8). Una de ellas es la que reconoce los PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), y otra la que reconoce los efectores producidos por los patógenos. Los PAMPs son compuestos presentes en los potenciales patógenos o compuestos derivados de la degradación de los componentes de la pared celular vegetal que son percibidos por receptores-PAMPs específicos. Los PAMPs han recibido también el nombre de elicitores generales. Los PAMPs incluyen lipopolisacáridos, peptidoglicanos o la flagelina. Dado que los microorganismos no patogénicos también producen PAMPs, la palabra "Pathogen" no se emplea correctamente y recientemente se ha preferido emplear el término MAMPs (Microbe Associated Molecular Pattern). La percepción de estos MAMPs a través de receptores-MAMPs enciende lo que se conoce como resistencia basal. Subyacente a este tipo de reconocimiento se encuentra lo que se ha denominado resistencia no hospedero (ver capítulo VI.C) (figura 8). Durante el proceso evolutivo los patógenos han logrado generar un mecanismo que les permite bloquear las respuestas de defensa inducidas en la plantas como consecuencia de este reconocimiento. Los patógenos han logrado esto al secretar cierto tipo

de proteínas, llamadas efectores, las cuales alteran la vía de señalización o la expresión de las respuestas de defensa (ver capítulo VIII.B.6.5) (figura 8). Durante ese proceso evolutivo las plantas a su vez desarrollaron un mecanismo altamente especializado que es capaz de detectar dichos efectores y que depende de las proteínas de resistencia (figura 8).



**Figura 8.** Evolución de las dos ramas del sistema inmune en plantas. En un principio las plantas desarrollaron receptores que reconocen estructuras propias de los microbios (MAMPs) para activar las respuestas de defensa basales. Los patógenos a su vez desarrollaron efectores que al ser inyectados a las células vegetales suprimen las respuestas de defensas basales de las plantas. A su vez las plantas generaron a través de la evolución un sistema que permitía detectar la actividad de los efectores a través de las proteínas R y activar así las respuestas de defensa.

Una vez se ha establecido el reconocimiento, ya sea a través de receptores MAMPs o mediado por las proteínas R, son varias las respuestas que se desencadenan; una de ellas es la muerte celular localizada (Program Cell Death, PCD) en las células que rodean el sitio de infección. Esta PCD se conoce como respuesta hipersensible (RH). La RH tiene como objetivo detener la colonización del patógeno y confinarlo en un reducido número de células. También se producen especies de oxígeno reactivas (ROS) que son tóxicas para los patógenos y una serie de cambios en los flujos iónicos. Se activa una vía de transducción de señales en las que están implicados varios genes y en la cual las MAP kinasas tienen un rol importante. Finalmente, producto de la activación de MAP kinasas

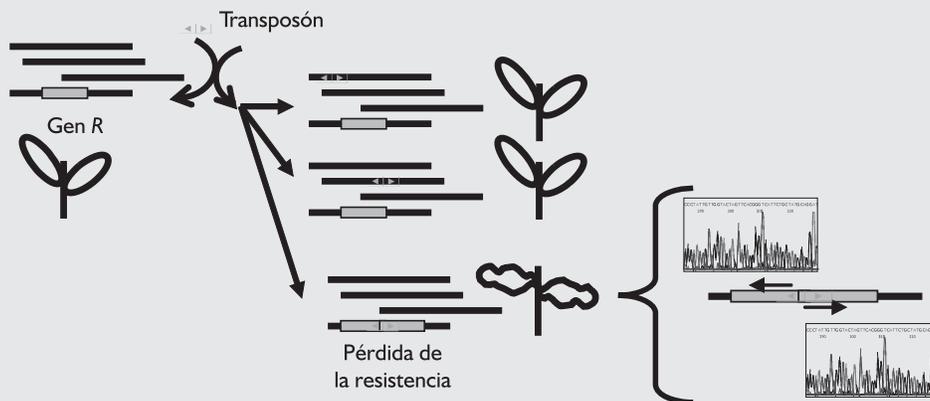
se activan factores de transcripción específicos que permiten la expresión de genes con diferentes tipos de actividades antimicrobianas, conocidos como genes *PR* (Pathogenesis Related). Acompaña a estas respuestas de defensa la acumulación de ácido salicílico (AS), que está asociada con la expresión de genes de defensa. Todos estos aspectos se presentarán en detalle en el capítulo X.

Durante el proceso de comunicación molecular que se establece entre las plantas y los microorganismos, las proteínas que son capaces de reconocer a los patógenos están en el origen de la activación de los mecanismos de defensa. Según el modelo genético de gen por gen, propuesto por Flor, las proteínas R actuarían como receptores de las proteínas efectoras producidas por los patógenos, las cuales funcionarían como ligandos de estos receptores. Desde hace más de 50 años varios genes de resistencia ya habían logrado ser ubicados en los mapas genéticos de ligamiento de diferentes especies vegetales. Sin embargo, fue necesario esperar hasta 1995 para que los genes *R* fueran clonados y caracterizados molecularmente. La razón por la cual hubo necesidad de esperar tantos años radica en la dificultad de aislar dichos genes. Los primeros genes de resistencia fueron clonados gracias a metodologías como mapeo posicional y *transposon tagging* (BOX 3 y 4). La identificación de los genes *R* revolucionó el campo de la Fitopatología Molecular y ha contribuido de manera significativa al entendimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en las respuestas de defensa de las plantas. De manera extraordinaria, la caracterización molecular de las proteínas R mostró que a pesar de haber sido identificadas en especies vegetales tan diversas como tabaco, *Arabidopsis*, arroz, tomate o lino y conferir resistencia a patógenos tan disímiles como virus, bacterias, hongos o nemátodos, las proteínas que ellos codificaban compartían características estructurales comunes (tabla 5 y figura 9). La presencia de estos dominios conservados en las proteínas R sugería que ellas activaban vías de transducción de señales comunes para encender las respuestas de defensa y permitió además agruparlos en diferentes clases, según si presentaban o no ciertos dominios estructurales (tabla 5 y figura 9). Hasta el día de hoy más de 50 genes *R* han sido clonados y caracterizados molecularmente en diferentes especies vegetales. La primera clase representa la mayoría de genes *R* hasta hoy descritos y codifican para proteínas que poseen un dominio NBS (Nucleotide Binding Sites) y un dominio LRR (Leucine Rich Repeats). Esta clase suele subdividirse en dos subclases según posean un dominio TIR (Toll Interleukin 1 Receptor) o una estructura de tipo CC (Coiled Coil) en su extremo N-terminal, TNL y CNL respectivamente. Se considera que todas las proteínas de tipo NBS-LRR son citoplasmáticas. La segunda clase está formada por las proteínas Cf de tomate que poseen únicamente un dominio LRR extracelular. La tercera clase está formada por la proteína Xa21 de arroz que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y posee un dominio LRR extracelular y un dominio serina-treonina kinasa (STK) intracitoplasmático. Recientemente, nuevos genes *R* han sido clonados y han mostrado nuevas características estructurales. La proteína RRS1 de *Arabidopsis*,

la cual confiere resistencia a *Ralstonia solanacearum*, posee una estructura de tipo TNL pero además tiene en su extremo C-terminal una señal de localización nuclear y un dominio de activación transcripcional de tipo WRKY. Este tipo de dominio está presente en los factores de transcripción que permiten la expresión de varios genes de tipo *PR* durante las respuestas de defensa de las plantas (ver capítulo XII). Se ha demostrado igualmente que esta proteína se localiza en el núcleo de las células vegetales. Se ha considerado a la proteína RRS1 como “la piedra de Roseta” que permitirá dilucidar el puente que se establece entre

### BOX 3 TRANSPOSON TAGGING

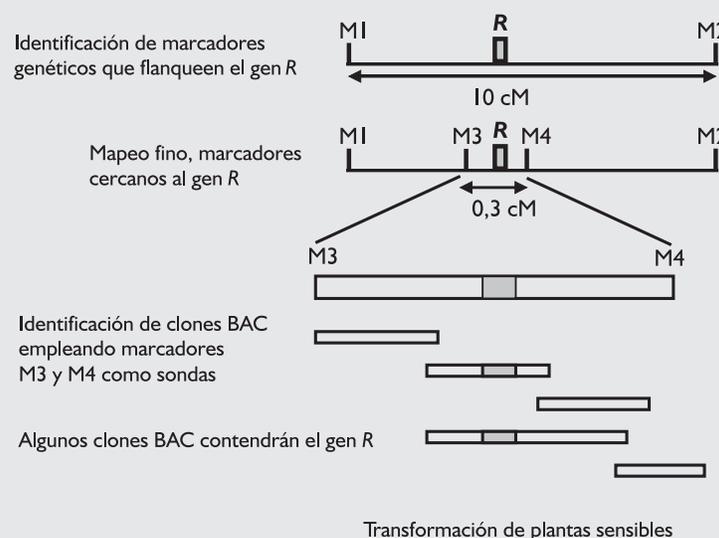
La identificación de genes y la caracterización de su función se han hecho posibles en gran medida debido al empleo de poblaciones mutantes. La vía más común para generar estas poblaciones mutantes es a través de la inserción de transposones. Otra vía de generación de estas poblaciones mutantes es mediante la inserción del T-ADN presente en el plásmido de *Agrobacterium*. La inserción de estos segmentos de ADN puede ocurrir dentro de un gen modificando así su función. La inserción puede suceder tanto dentro de la región codificante, lo que genera alelos nulos, como también dentro del promotor, en cuyo caso alterará la expresión del gen. Las plantas poseen diferentes tipos de elementos transponibles, dentro de los cuales se encuentran los transposones, como *Mu*, *Ac/Ds*, *En/Spm* y *Tam*. Estos elementos transponibles han sido ampliamente usados en maíz, y también han sido transferidos con éxito a otras especies como *Arabidopsis*, lino y tomate. Este tipo de elementos se transfieren a las plantas a través de sistemas de transformación mediada por *Agrobacterium*. La población así obtenida estará formada por individuos dentro de los cuales el segmento de ADN se habrá insertado aleatoriamente en una región genómica particular. La obtención de un alto número de individuos permitirá aumentar la probabilidad de que en dicha población exista al menos un individuo con cada uno de los genes mutados. Posteriormente esta población se analiza por la pérdida del carácter fenotípico buscado. De esta forma cada uno de los genes dentro del genoma queda “etiquetado”. Ya que la secuencia del transposón o del T-ADN es conocida, resulta relativamente fácil obtener la secuencia del gen mediante PCR inverso y secuenciación.



el proceso de reconocimiento y la activación de las respuestas de defensa. Recientemente se ha clonado el gen *Xa27* de arroz que confiere resistencia a *X. oryzae* pv. *oryzae*. Curiosamente, la proteína codificada por este gen no presenta ninguno de los dominios estructurales conservados, descritos anteriormente,

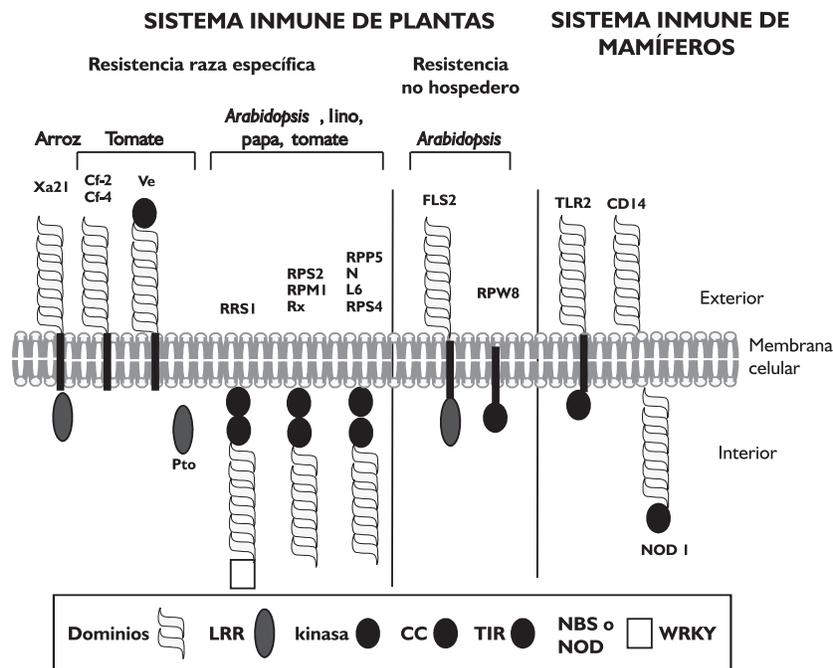
#### BOX 4 MAPEO POSICIONAL

La clonación de genes por mapeo posicional se basa en la cosegregación entre un fenotipo y marcadores moleculares. El mapeo posicional requiere como primera medida un mapa genético enriquecido en marcadores moleculares. Actualmente existe una vasta gama de técnicas que permiten la generación de un amplio número de marcadores moleculares, como RFLPs, microsatélites (SSRs), RAPDs, AFLPs y, más recientemente, SNPs. Estos marcadores se ubican en un mapa genético a partir de la segregación que presentan dentro de una población obtenida de un cruce entre dos parentales contrastantes. La característica fenotípica se evalúa igualmente en la población, y a partir de su segregación se ubica en una región genómica en el mapa genético correspondiente. El mapeo fino permite la localización de nuevos marcadores moleculares, cada vez más cercanos al loci de la característica fenotípica. Cuando la distancia de los dos marcadores adyacentes al loci (uno a cada lado) sea suficientemente pequeña (alrededor de 0,2 centimorgan), estos marcadores pueden emplearse como sondas sobre una librería genómica (de cósmidos, YACs o BACs), para identificar los clones que contienen estos marcadores. Posteriormente los clones obtenidos se ensamblan en un *contig* y se identifican los clones que posiblemente contienen el gen responsable de la característica fenotípica. Estos clones se transforman en variedades que no presentan la característica; y las plantas generadas que posean el fenotipo corresponderán a aquellas que han recibido el clon que contiene el inserto con el gen. La secuenciación completa del clon correspondiente permite entonces la identificación del gen responsable de la característica de interés.



y no tiene similitudes importantes con las proteínas de las bases de datos. Los genes de resistencia *Ve* de tomate contra *Verticillium albo-atrum* codifican glicoproteínas de superficie; el dominio LRR, se cree, es de tipo extracelular.

Las clases de genes *R* descritas precedentemente hacen parte de la resistencia raza específica o cualitativa. Los genes que codifican para los receptores MAMPs han sido difíciles de caracterizar dado que en realidad no se conoce su actividad bioquímica. El ejemplo más conocido y estudiado de los genes *R* de tipo no hospedero es el gen *FLS2*. *FLS2* reconoce un péptido de 22 aminoácidos llamado flagelina, que es un componente importante del flagelo de todas las bacterias Gram-negativas. La flagelina es capaz de inducir igualmente las respuestas de defensa en organismos como insectos, mamíferos y plantas. Curiosamente, la proteína *FLS2* posee también un dominio LRR extracelular y un dominio kinasa citoplasmático, es decir, comparte la misma estructura que la proteína *Xa21*. Sorprendentemente la estructura de los genes receptores del sistema inmune en mamíferos e insectos presenta dominios estructurales similares a las proteínas *R* de plantas. En mamíferos, los receptores TLR (Toll Like Receptors) reconocen directa o indirectamente ciertas moléculas producidas por los patógenos. Los TLR se caracterizan por poseer un dominio LRR extracelular y un dominio TIR intracelular.



**Figura 9.** Estructura de las proteínas R presentes en plantas y de proteínas implicadas en el reconocimiento de patógenos en el sistema inmune de vertebrados. Se representan las proteínas implicadas en los dos tipos de resistencia de las plantas (raza específica y no hospedero) y también la putativa localización de estas proteínas en las células vegetales.

**Tabla 5.** Algunos ejemplos de genes *R* y genes *Avr* caracterizados en diferentes patosistemas.

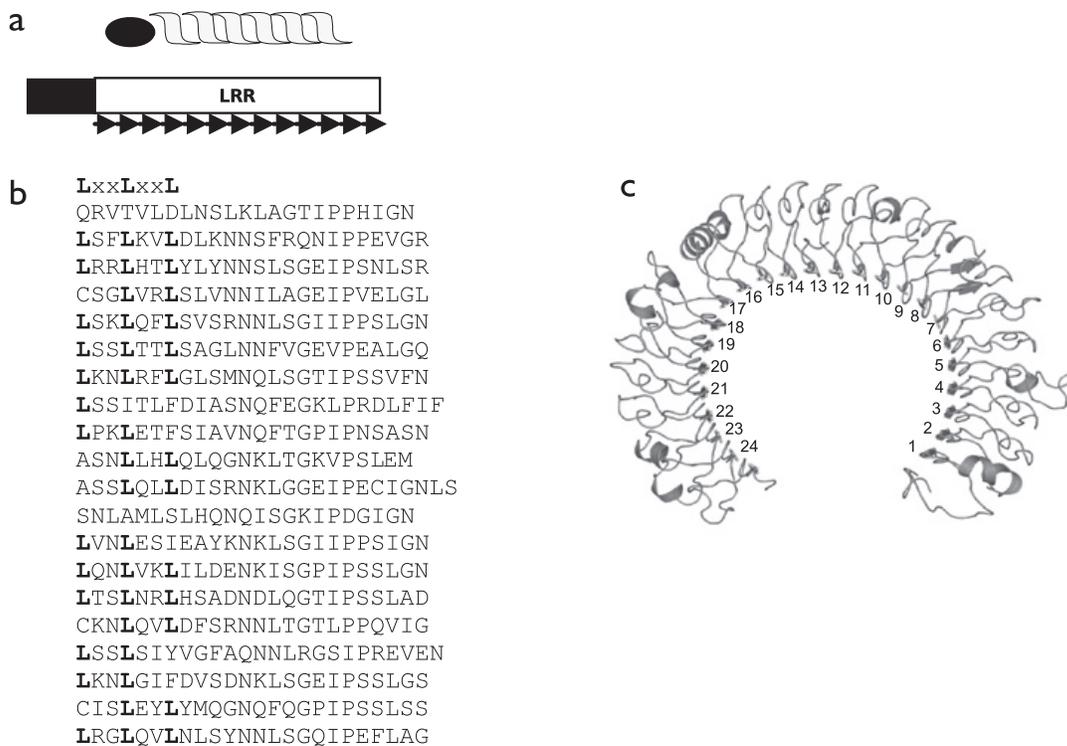
Especie vegetal	Gen <i>R</i>	Estructura gen <i>R</i>	Patógeno	Gen <i>Avr</i>
Tomate	<i>Pto</i>	STK	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrPto</i>
Arabidopsis	<i>RPW8</i>	LZ	<i>Erysiphe</i>	<i>Avr RPW8</i>
Arabidopsis	<i>RPM1</i>	CNL	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<i>AvrRpm1</i> , <i>AvrB</i>
Arabidopsis	<i>RPP8</i>	CNL	<i>Peronospora paristica</i>	<i>AvrRpp8</i>
Arabidopsis	<i>RPS2</i>	CNL	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrRpt2</i>
Arabidopsis	<i>RPS5</i>	CNL	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrPphB</i>
Papa	<i>Rx</i>	CNL	Virus X de la papa	Proteína de la cápside
Cebada	<i>Mla6</i>	NL	<i>Blumeria graminis</i>	<i>AvrMla6</i>
Arroz	<i>Pi-ta</i>	NL	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>AvrPita</i>
Arabidopsis	<i>RPP5</i>	TNL	<i>P. parasitica</i>	<i>AvrRPP5</i>
Arabidopsis	<i>RPS4</i>	TNL	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	<i>AvrRps4</i>
Lino	<i>L6</i>	TNL	<i>Melampsora lini</i>	<i>AvrL6</i>
Lino	<i>M</i>	TNL	<i>M. lini</i>	<i>AvrM</i>
Tabaco	<i>N</i>	TNL	Virus del mosaico del tabaco	Replicasa
Tomate	<i>Cf-2</i>	LRR	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr2</i>
Tomate	<i>Cf-4</i>	LRR	<i>C. fulvum</i>	<i>Avr4</i>
Tomate	<i>Cf-5</i>	LRR	<i>C. fulvum</i>	<i>Avr5</i>
Tomate	<i>Cf-9</i>	LRR	<i>C. fulvum</i>	<i>Avr9</i>
Arroz	<i>Xa21</i>	LRR STK	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>AvrXa21</i>
Arabidopsis	<i>RRS1</i>	WRKY-TNL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Pop2</i>

## A. LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES

### I. EL DOMINIO LRR

El dominio LRR consiste en múltiples repeticiones de aminoácidos seriados (alrededor de 24) que contienen leucinas u otros aminoácidos hidrofóbicos a intervalos regulares (figura 10). La secuencia consenso que define un LRR es LxxLxxL, en donde L representa la leucina y x cualquier aminoácido. El dominio LRR se presenta en proteínas que tienen la capacidad de interactuar con

otras proteínas. Así, por ejemplo, en mamíferos los receptores de hormonas que reconocen ligandos glicoproteicos o inhibidores enzimáticos interactúan con sus ligandos a través del dominio LRR. Por esta razón (y otras evidencias sustanciales que se describen más adelante), se ha llegado a sugerir que el dominio LRR presente en las proteínas R estaría implicado en el reconocimiento y la interacción con las proteínas producidas por el patógeno. Dado que no ha sido posible obtener la estructura tridimensional de ninguna proteína R, ha sido difícil establecer una relación entre la estructura y la función de este dominio en el reconocimiento de proteínas del patógeno. Sin embargo, a partir de la similitud del dominio LRR de las proteínas R con el inhibidor de ribonucleasa porcina, cuya estructura ha sido establecida, se han identificado plegamientos de tipo hojas  $\alpha$  y hojas  $\beta$  y que las leucinas conservadas se encuentran dentro del centro hidrofóbico de la proteína, mientras que los otros residuos variables forman una superficie expuesta al solvente que le permitiría interactuar con otras proteínas presentes en el medio (figura 10).



**Figura 10.** a. Representación esquemática de una proteína NBS-LRR en donde se muestran las diferentes unidades repetitivas del LRR (flechas). b. Secuencia de aminoácidos de un dominio LRR de una putativa proteína NBS-LRR, en donde se observan las diferentes unidades repetitivas y la secuencia LxxLxxL consenso; se emplea el código de aminoácidos de una letra. c. Estructura del dominio LRR presente en una proteína de mamíferos obtenido a partir de la estructura cristalina. Se observa una superficie expuesta al solvente y una región interna. (Tomado de <http://www.scripps.edu/news/sk/sk2005/sk05wilson.html>).

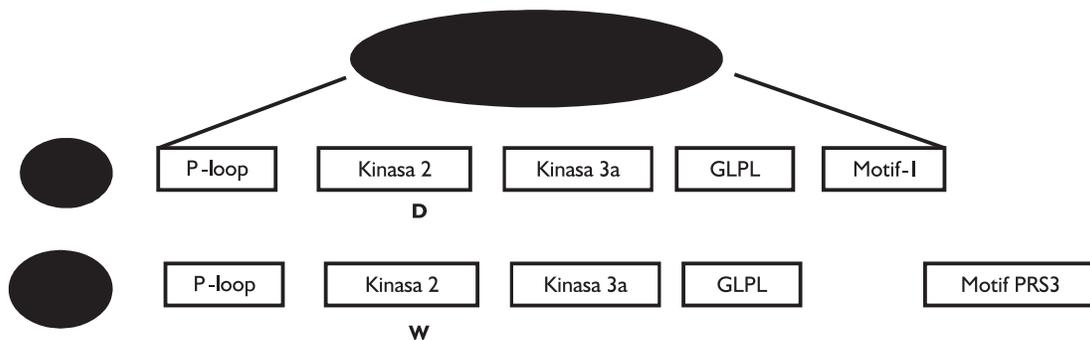
Estudios comparativos de secuencia del dominio LRR de diferentes proteínas R han permitido determinar que en muchos casos este dominio puede tener una estructura bipartita. Los análisis de tasas de sustituciones nucleotídicas sinónimas ( $K_s$ , las cuales no causan cambios en los aminoácidos) y no sinónimas ( $K_a$ , las cuales sí producen cambios en la secuencia de aminoácidos) en genes estrechamente relacionados han permitido estudiar las presiones selectivas a las cuales están sometidas las proteínas. Si se asume selección neutral, entonces  $K_s$  es igual a  $K_a$ . Sin embargo, para la mayoría de los genes, los cambios de aminoácidos producen la pérdida de la función de la proteína y entonces las sustituciones no-sinónimas se seleccionan en contra, haciendo que  $K_a < K_s$ . En el dominio LRR de los genes *R* se han encontrado dos regiones: una en la cual  $K_a < K_s$  (lo que sugiere que está sometida a selección neutral) y otra en donde  $K_a > K_s$ . Esta segunda región corresponde a aquella que está expuesta al solvente, en donde la selección diversificadora ha jugado un papel importante. Este hecho parece estar relacionado con la capacidad de generar variantes de manera rápida, lo que permite reconocer diferentes determinantes del patógeno. El número de repeticiones LRR puede variar entre miembros de la misma familia. En el locus *Cf2/5* de tomate existen miembros en los cuales el número de LRR puede variar entre 25 y 38, lo que sugiere que el número de repeticiones juega un rol importante en la especificidad en el reconocimiento de las moléculas del patógeno.

La comparación entre alelos de la proteína de resistencia L de lino, que pertenece a la familia TNL y en la cual cada uno de los alelos confiere especificidades a diferentes razas de *M. lini*, ha permitido dar indicios sobre la función del dominio LRR en el reconocimiento y especificidad. Los análisis de secuencia de los alelos *L6* y *L11* permitieron identificar que las proteínas codificadas por estos dos genes son idénticas en los primeros 620 aminoácidos y las diferencias se concentran básicamente en la región LRR. Experimentos de *domain swapping*, en el cual el LRR del gen *L2* fue combinado con la región N-terminal de *L6* o *L10*, generaron un gen con la especificidad de *L2*, lo que dio sustento a que la especificidad de la proteína R se encuentra en el LRR. De igual manera, la delección de una unidad repetitiva del LRR o mutaciones puntuales en residuos específicos dentro del LRR son suficientes para inactivar la resistencia. Todos estos argumentos favorecen la hipótesis de que el dominio LRR estaría implicado en el reconocimiento, especificidad e interacción con las proteínas producidas por el patógeno.

## 2. EL DOMINIO NBS

El dominio NBS se presenta en una gran variedad de proteínas que tienen actividad de unión a ATP o GTP, como adenilato ciclasa, ATP sintasas y las proteínas implicadas en apoptosis como APAF-1 (humanos) y CED-4 (*Caenorhabditis elegans*). El dominio NBS se caracteriza por poseer una serie de motivos que consisten en aminoácidos altamente conservados. Estos incluyen el P-loop, el

kinasa 1a, el kinasa 2 y el GLPL (figura 11). Además de estos motivos conocidos de tiempo atrás, se ha demostrado que en los genes de tipo NBS-LRR, asociados al dominio TIR posterior a la secuencia P-loop, se encuentra una secuencia consenso LQKKLLSKL (RNBS-A TIR); mientras que en los genes de tipo CNL esta secuencia está ausente, pero presentan la secuencia FDLxAWVCVSQxF (RNBS-A no TIR). Un solo aminoácido dentro del motivo kinasa 2 (LLVLDDVW/D), que puede ser aspartato (D) o triptófano (W), puede usarse para predecir la presencia/ausencia del dominio TIR con un 95% de confianza (figura 11). La homo-hexamerización de la proteína APAF-1 provoca su unión con el ATP e induce la hidrólisis del ATP, lo que permite la activación de la vía de señalización durante la apoptosis en mamíferos. Se ha sugerido que un mecanismo similar puede ocurrir con el dominio NBS presente en las proteínas R de plantas. Estudios recientes han mostrado que el dominio NBS de dos proteínas de resistencia (Mi e I2) puede unirse e hidrolizar el ATP in vitro; y recientemente se ha demostrado además la oligomerización para el caso de la proteína N de tabaco. Diferentes análisis mutacionales dentro del dominio NBS han permitido demostrar que este dominio es importante para desencadenar las respuestas de defensa de las plantas.



**Figura 11.** Estructura del dominio NBS presente en las proteínas R. Se muestran los motivos que constituyen el dominio NBS y los motivos presentes/ausentes en las proteínas NBS-LRR que contienen un dominio TIR o un dominio Coiled Coiled en la región N-terminal. Se representan igualmente los aminoácidos diagnósticos (D y W) presentes en el motivo kinasa 2, los cuales permiten predecir con un 95% de confianza la presencia/ausencia del dominio TIR.

### 3. EL DOMINIO TIR

El dominio TIR se define sobre la base de su similitud con las proteínas Toll de *Drosophila* y con los receptores 1 de interleukinas (IL-1R) presentes en mamíferos y aves. Con base en la función de estos dominios en mamíferos, se cree que el papel del dominio TIR en las proteínas R es interactuar con proteínas de la vía de señalización. Por ejemplo, IL-1R al responder a la citoquinina

IL-1 permite la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B, lo cual activa los genes de defensa en mamíferos. Análisis mutacionales han permitido identificar aminoácidos críticos para la función no solamente de las proteínas TLR en animales, sino también en las proteínas R de plantas. Las comparaciones de los alelos *L6* y *L7* de las proteínas R de lino que confieren diferentes especificidades han mostrado que son idénticas y que difieren solamente en 11 aminoácidos ubicados en los primeros 208 aminoácidos correspondientes a la región TIR, lo cual sugiere que este dominio puede estar igualmente implicado en el reconocimiento y/o la especificidad. Inicialmente se consideró que este tipo de secuencias estaba ausente en monocotiledóneas; sin embargo, recientemente se ha demostrado que el genoma de arroz puede contener genes que codifican para el dominio TIR; estas proteínas pueden poseer o no el dominio NBS, pero no presentan el dominio LRR. Aún no se sabe si este tipo de proteínas tiene un rol en la resistencia a pesar de que está ubicado en regiones genómicas ricas en genes *R*. Las proteínas con dominios TIR podrían representar un tipo de familias presentes tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, no detectadas previamente o presentes en un tipo ancestral que divergió significativamente en monocotiledóneas.

#### 4. EL DOMINIO COILED COIL

El dominio CC se caracteriza por poseer una leucina cada siete aminoácidos, intercalada por aminoácidos hidrofóbicos formando una estructura de  $\alpha$ -hélice anfipática. Uno de los ejemplos más conocidos de este tipo de estructura es la cremallera de leucina. Es un dominio que está presente en una amplia variedad de proteínas con funciones biológicas muy diversas y está implicado en interacciones proteína-proteína, incluyendo la oligomerización. Su rol en la resistencia aún no se conoce, pero se ha visto por análisis mutacionales que es importante para el caso de la proteína RPS2 en *Arabidopsis*. Se sugiere que es un dominio implicado más en señalización que en reconocimiento.

#### 5. EL DOMINIO STK

La modulación del estado de fosforilación de las proteínas es uno de los principales mecanismos que han empleado los seres vivos para controlar la actividad de proteínas. Las proteínas kinasas son las encargadas de fosforilar residuos específicos dentro de ciertas proteínas. Las kinasas poseen 11 subdominios y 15 aminoácidos invariantes que las caracterizan. El dominio STK está presente en las proteínas Pto de tomate y Xa21 de arroz. En el caso de Pto se ha demostrado que la proteína es capaz de autofosforilación y que esta es necesaria para su interacción con AvrPto y desencadenar las respuestas de defensa. El dominio STK de Xa21 es también capaz de autofosforilar la proteína en múltiples residuos por un mecanismo intramolecular.

## 6. EL DOMINIO WRKY

Las proteínas WRKY son factores de transcripción del tipo dedos de cinc que están presentes exclusivamente en plantas. Este tipo de factores de transcripción es específicamente activado durante algunas respuestas de defensa de las plantas. El estudio de promotores de varios genes de tipo *PR* ha permitido mostrar que estas regiones abundan en cajas W, que son los elementos del promotor que contienen los sitios de unión al ADN de este tipo de factores de transcripción. Hasta el momento la única proteína R que presenta el dominio WRKY es RRS1 de *Arabidopsis*. La presencia adicional de los dominios NBS y LRR en esta proteína sugiere que ella está implicada tanto en el reconocimiento como en la expresión de los genes de defensa, lo que se constituirá en una vía de señalización extremadamente condensada. El principio de “la piedra de Roseta” establece que la evolución ha favorecido la recombinación de genes, permitiendo la fusión de dominios, presentes originalmente en proteínas separadas pero funcionalmente relacionadas, en una sola cadena polipeptídica. La proteína RRS1 sería una manifestación de este principio, en donde se han fusionado los dominios LRR (reconocimiento) y WRKY (activación de las respuestas).

### B. FUNCIÓN, LOCALIZACIÓN Y REGULACIÓN

Teniendo en cuenta el modelo gen por gen propuesto por Flor, se ha establecido que la función principal del producto de los genes *R* es el reconocimiento de las proteínas Avr producidas por los patógenos. En términos moleculares, las proteínas R actuarían como receptores de los productos Avr. La única función atribuida y demostrada hasta hace relativamente poco de los genes que codifican proteínas de tipo NBS-LRR era la resistencia. De las 150 o 600 secuencias de tipo NBS-LRR presentes en el genoma de *Arabidopsis* y arroz, respectivamente, a solo un bajo porcentaje de ellas se les ha asignado una función en resistencia. La función para muchas proteínas de este tipo está aún por demostrarse. Recientemente se ha reportado que la expresión constitutiva o condicional del gen *ADR1*, el cual codifica una proteína CNL que confiere resistencia a un amplio espectro de cepas de *Peronospora parasitica* y *Erysiphe cichoracearum*, confiere una significativa mayor tolerancia a la sequía en plantas de *Arabidopsis*. Estos resultados sugieren que quizás proteínas de tipo NBS-LRR posean otras funciones diferentes a la de resistencia.

La mayoría de proteínas R carecen de péptido señal y se considera que su ubicación es intracitoplasmática (figura 9). Existen unas pocas proteínas que poseen un dominio transmembranal y el dominio LRR es extracelular. Un importante número de estudios sugieren que las proteínas R colocalizan con los efectores de los patógenos. Así, por ejemplo, las proteínas efectoras virales están presentes dentro de las células vegetales y, hasta el momento, las proteínas R contra virus caracterizadas parecen ser intracelulares. Las proteínas efectoras

del hongo *C. fulvum* se encuentran en el espacio extracelular y las proteínas R correspondientes (Cf) poseen un dominio LRR extracelular. La proteína AVR-Pita producida por el hongo extracelular *Magnaporthe grisea* para ser funcional debe ser inyectada dentro de la célula vegetal. La proteína R correspondiente (Pi-ta) es también una proteína intracelular. El mecanismo por el cual el *M. grisea* introduce la proteína Avr al interior de la célula aún no se conoce. Todas las proteínas R contra bacterias fitopatógenas parecen ser intracelulares, a excepción de Xa21. Varios estudios han mostrado que las proteínas efectoras de bacterias son funcionales solamente cuando son introducidas dentro de la célula vegetal (ver capítulo VIII.B). Esto permitió postular la hipótesis ya confirmada de que las proteínas R correspondientes están localizadas dentro del citoplasma. El efector correspondiente a Xa21 aún no se ha identificado, pero estudios preliminares indican que puede ser una proteína secretada al apoplasto por el sistema de secreción tipo II (BOX 2) en donde podría interactuar con el dominio LRR extracelular de Xa21. Es importante señalar que la localización de las proteínas R puede depender del efector. Ya varios estudios han mostrado que, una vez se ha producido la interacción entre las proteínas R y el efector correspondiente, esta es translocada al núcleo; lo que demuestra que las proteínas R durante la activación de las respuestas de defensa pueden encontrarse en diferentes localizaciones subcelulares.

Poco es lo que se conoce sobre los mecanismos de regulación de los genes R. Dado que las plantas necesitan reconocer de manera rápida el ataque de un patógeno, la mayoría de los genes R pueden ser expresados constitutivamente y a un nivel muy bajo en plantas sanas. Una vez han detectado el patógeno, los genes R pueden ser inducidos temporalmente para después alcanzar niveles de expresión basales. En algunos casos se ha demostrado que la inoculación con el patógeno induce específicamente la expresión de los genes R, como en el caso del gen *Xa1* de arroz. Más recientemente fue posible la clonación del gen *Xa27* en arroz que confiere resistencia a cepas de *X. oryzae* pv. *oryzae* que poseen el gen *AvrXa27*. El gen *Xa27* está presente tanto en variedades resistentes como en variedades susceptibles. La diferencia entre ellas se halla en la secuencia de la región promotora. En las variedades resistentes, *AvrXa27* es capaz de inducir la expresión del gen R; mientras que esto no ocurre en las variedades susceptibles. Sin embargo, el mecanismo que controla la activación de este gen o los factores de transcripción implicados todavía no se ha descrito. La degradación proteica (X.B.10) también ha sido considerada como un mecanismo para regular la actividad de las proteínas R. De igual manera existe un par de estudios que han mostrado que el dominio LRR puede establecer interacciones intramoleculares con el dominio NBS de la misma proteína para regular su función. En plantas de papa, una vez se produce la infección viral la proteína de la cápside del virus PVX (actuando como un elicitor) altera la interacción entre el dominio LRR y NBS de la proteína Rx, lo que permite el encendido de las respuestas de defensa.

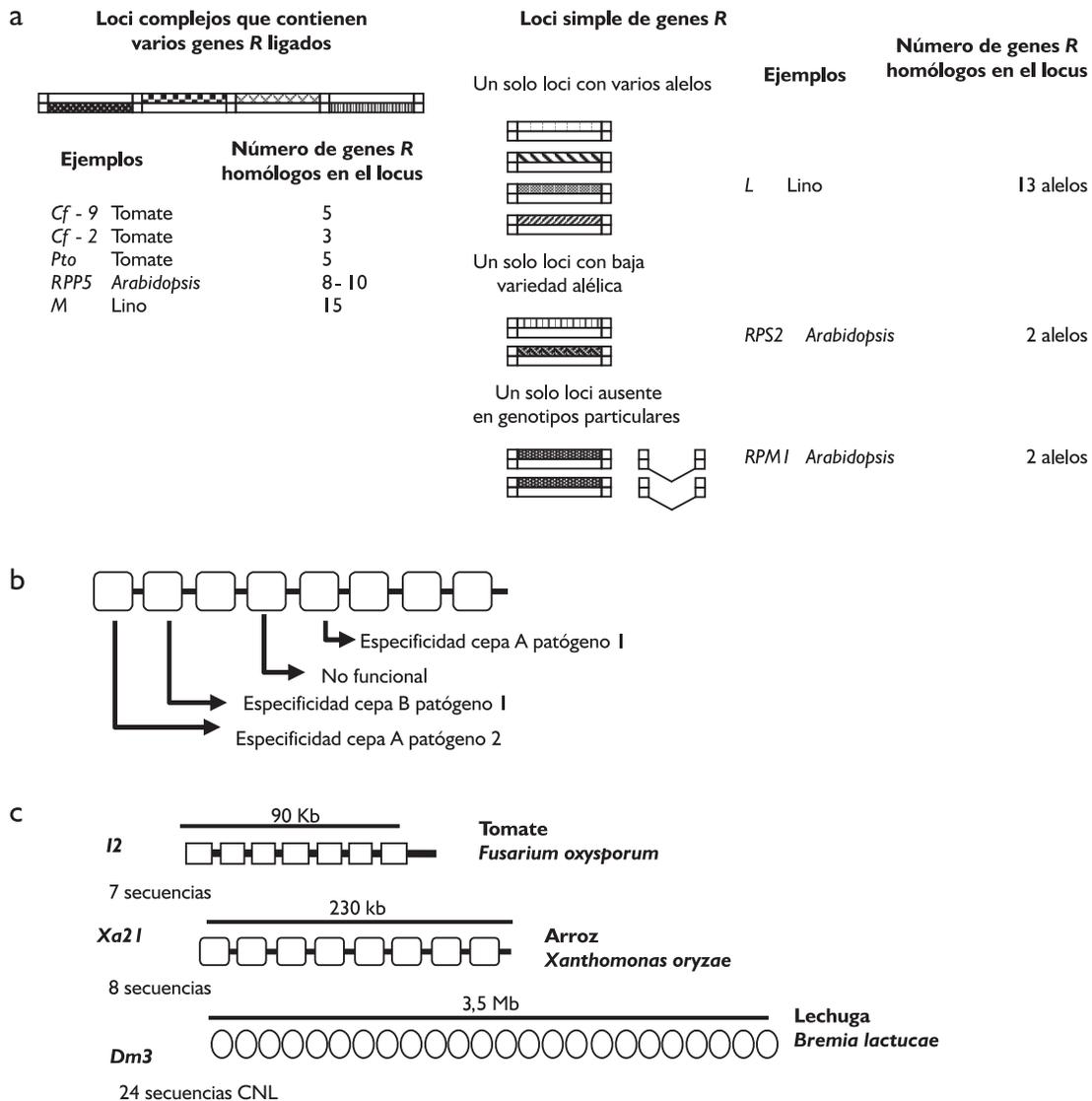
### C. SPLICING ALTERNATIVO Y FORMAS TRUNCADAS

Dentro de la familia de genes TNL y CNL se presentan genes que muestran procesos de *splicing* alternativo. En el caso de los TLR, en animales son bien documentados los procesos de *splicing* alternativo como mecanismos de generar variantes y mediante bucles de retroalimentación regular la expresión de este tipo de genes. En particular, este es un mecanismo que controla la expresión de TLR4, cuya expresión descontrolada traería efectos deletéreos a las células. En plantas se ha visto que el reconocimiento del patógeno induce variantes de los genes que codifican proteínas NBS-LRR mediante *splicing* alternativo, lo que sugiere que este mecanismo puede jugar también un rol en la regulación de la expresión de estos genes. Múltiples transcritos han sido detectados en varios genes de tipo TNL, tales como *RPP5*, *RPS4* en *Arabidopsis*, *L6* en lino, *N* en tabaco, *Y-1* en papa y *Bs4* en tomate. Los principales intrones implicados en el *splicing* alternativo son el 2 y el 3. Los mecanismos de *splicing* alternativo incluyen el uso de exones alternativos, la retención de intrones y el empleo de sitios de *splicing* 5' y 3' alternativos.

El primer caso de *splicing* alternativo fue reportado en el gen *N* de tabaco que confiere resistencia al virus TMV. El gen *N* codifica dos transcritos denominados  $N_S$  y  $N_L$  vía *splicing* alternativo del exón presente en el intrón 3. El transcrito  $N_S$  que contiene la proteína entera es más abundante antes y durante las 3 primeras horas de infección. El transcrito  $N_L$  codifica una proteína en la cual faltan 13 de las 14 unidades LRR y es más abundante 4-8 horas después de la inoculación. Empleando plantas transgénicas que solo expresan la forma  $N_S$  o  $N_L$ , se demostró que son necesarias las dos formas para obtener una resistencia completa. Una situación similar se ha observado con el gen *RPS4* de *Arabidopsis* en el cual se generan formas alternativas por la retención del intrón 3 o de los intrones 2 y 3; intrones que producen cambios en el marco de lectura y generan codones de parada justo después de la región NBS. La eliminación de uno o ambos intrones suprime la función de *RPS4*. Se demostró igualmente que la presencia de un transgén que contiene solamente los dominios TIR y NBS no es suficiente para conferir resistencia. La presencia de formas truncadas de las proteínas R que carecen de LRR y que son importantes para conferir una resistencia completa, sugiere que estas formas truncadas ejercen un rol de regulador positivo. En consecuencia, se ha llegado a postular que el dominio LRR en las proteínas R de plantas puede tener una función de regulación negativa en ausencia de un elicitor codificado por los genes *Avr* del patógeno. Aún no se conoce el mecanismo por el cual es importante la presencia de las formas truncadas para conferir una resistencia completa. Sin embargo, se ha sugerido que las formas truncadas y completas pueden formar dímeros y hacer parte de complejos proteicos que permiten reclutar otras proteínas. Solamente dentro de este contexto molecular se podrían activar los mecanismos de defensa.

## D. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Los genes *R* se encuentran organizados en el genoma en dos formas principales: como loci sencillos o loci complejos (figura 12a). Los genes *RPS2*, *RPS4* y *RPM1* de *Arabidopsis* consisten en loci sencillos con un solo gen, el cual presenta una baja variación alélica a nivel de secuencia entre las diferentes variedades o ecotipos (figura 12a). En algunos casos, la secuencia del gen *R* puede estar ausente en ciertas variedades, ecotipos o líneas vegetales. Ecotipos de *Arabidopsis* que no poseen el gen *RPM1* presentan en la región genómica correspondiente una secuencia de 98 pb que no tiene ninguna relación con *RPM1* (figura 12a). Existen también genes *R* que, a pesar de estar formados por un solo gen, muestran una alta diversidad alélica, como el gen *L* de lino. Para este gen se han identificado 13 variantes alélicas; cada una de ellas confiere una especificidad particular contra cepas de *M. lini* (figura 12a). Sin embargo, la mayoría de los genes *R* forman familias multigénicas y se encuentran configurando *clusters* dentro del genoma, lo que se conoce con el nombre de loci complejos. Es decir que dentro del genoma existen grupos de genes *R* que residen físicamente muy cerca unos de otros (figura 12a). En estos grupos de genes *R* podemos encontrar genes de tipo TNL junto con CNL. En los loci complejos también se pueden encontrar varios genes *R* agrupados que confieren resistencia a patógenos diferentes como el gen *Mi* (resistencia contra nemátodos y áfidos) o a cepas de la misma especie de un patógeno como el locus complejo *Cf-2/Cf-5* de tomate (figura 12b). Muchas veces dentro de estos *clusters* de genes se encuentran copias no funcionales, secuencias interrumpidas por codones de parada, inserciones de transposones o genes *R* para las cuales no se conoce aún la especificidad (figura 12b). La mayor dificultad que plantea la presencia de *clusters* de genes *R* es que a través de mapeo resulta difícil identificar específicamente cuál de ellos es el responsable de la resistencia a una cepa determinada. Solo un mapeo muy fino que delimite muy estrechamente la región correspondiente a la resistencia permitirá establecer cuál de los varios genes presentes es el que confiere la resistencia. Los *clusters* de genes *R* pueden ser muy grandes y diversos en diferentes especies vegetales. En lino, por ejemplo, el locus *M* consiste en 15 o más miembros de la misma familia que se extiende sobre una distancia de menos de 1 Mb. El locus *Xa21* de arroz contiene ocho secuencias relacionadas que cubren una región de 230 kb, y el locus *Cf4/9* de tomate posee 5 secuencias génicas relacionadas en 35 kb. Uno de los *clusters* más grandes de genes *R* es el locus *Dm3* en lechuga, en el cual existen al menos 24 secuencias de tipo CNL que cubren una región de 3,5 Mb (figura 12c). Uno de los *clusters* más estudiados es el correspondiente al locus *RPP5* en *Arabidopsis* que confiere resistencia a *Peronospora parasitica*. La secuenciación completa de este locus en los ecotipos Landsberg erecta y Columbia ha permitido identificar la presencia de 10 u 8 copias, respectivamente; sin embargo, en Columbia solo dos de ellos no presentan mutaciones.



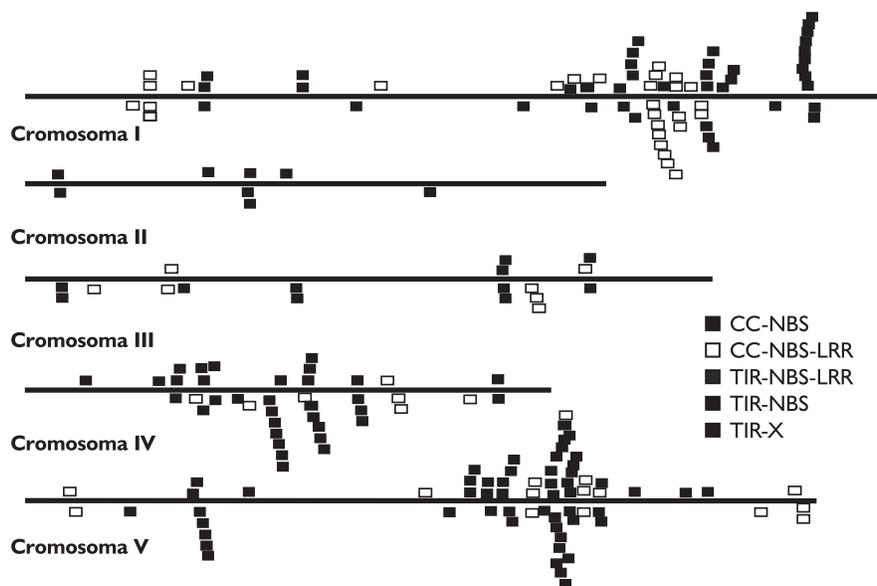
**Figura 12.** a. Organización de los genes R en locus complejos (*clusters*) o sencillos. b. Representación esquemática de un *cluster* de genes R en la cual cada gen puede tener diferentes especificidades. c. Ejemplos de *clusters* de genes R en diferentes especies vegetales.

## E. GENOMAS Y GENES R

Con la reciente posibilidad de secuenciar genomas enteros, se ha logrado obtener una imagen del número total de genes R que pueden estar presentes en el genoma de una planta. En *Arabidopsis* se ha estimado que existen 85 secuencias de tipo TNL distribuidas en 64 loci y 36 secuencias de tipo CNL repartidas en 30 loci. Además se presentan 15 secuencias de tipo TIR-NBS que no poseen dominios LRR. Se ha logrado identificar adicionalmente 2 secuencias

de tipo TNL que poseen un dominio WRKY, dentro de las cuales se encuentra el gen *RRS1*. La mayoría (46) de estas secuencias están como singletones, 50 se encuentran formando parejas y 21 se encuentran formando 7 *clusters*. Sin embargo, el número preciso de este tipo de secuencias depende de la calidad del sistema de anotación de los genes. También los análisis de secuencias del genoma completo han permitido identificar la presencia de posibles genes *R* truncados con varios codones de parada. Secuencias de tipo LRR-kinasas han sido igualmente identificadas en el genoma de *Arabidopsis*, de las cuales existen 174; sin embargo, para solo una de ellas, la correspondiente al gen *FLS2*, se ha demostrado una función en resistencia. En el genoma de *Arabidopsis* existen 860 genes que presentan un dominio STK, de los cuales 15 muestran más de 50% de identidad con el gen *Pto*. En *Arabidopsis* existen regiones con una gran densidad de genes de tipo NBS-LRR, principalmente en los cromosomas I, IV y V (figura 13). En el cromosoma IV existen dos grandes *clusters*, uno de los cuales contiene los miembros de la familia *RPP5*. En el cromosoma V, en una región de solo 4,5 Mb, existen más de 30 secuencias de tipo NBS-LRR.

El otro genoma de plantas que ha logrado ser secuenciado completamente es el de arroz. En arroz se ha logrado identificar aproximadamente 600 secuencias de tipo CNL, pero los genes de tipo TNL están completamente ausentes en el genoma de arroz y, quizás, en todas las especies de cereales. Si bien existen algunas secuencias que presentan el dominio TIR, estas secuencias no están acompañadas por el dominio LRR. Aproximadamente 450 genes en arroz codifican proteínas con dominios LRR extracelulares, la mitad de los cuales posee además un dominio kinasa en el extremo C-terminal.



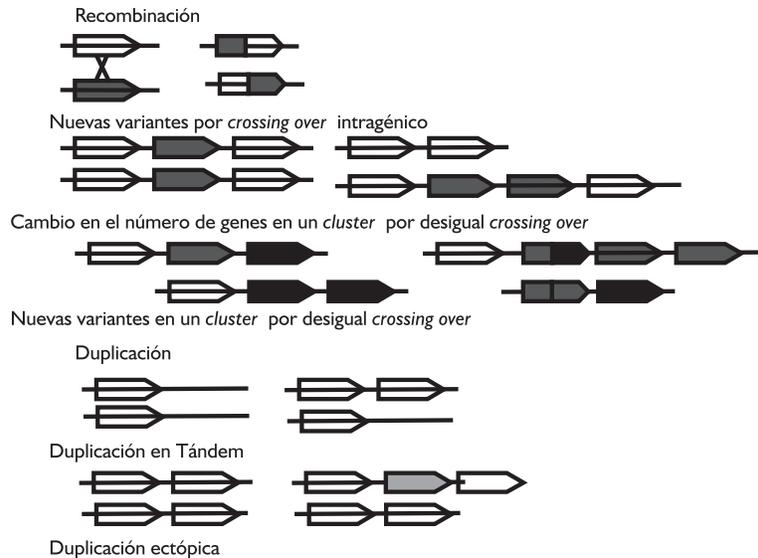
**Figura 13.** Localización física de genes *R* candidatos de tipo NBS en el genoma de *Arabidopsis*, a partir de la anotación hecha por Meyers et al. (2002).

## F. EVOLUCIÓN

Los patógenos pueden fácilmente mutar de avirulentos a virulentos gracias a la mutación de un solo gen *Avr* y generar así nuevas variantes que son capaces de romper la resistencia gobernada por genes *R*. Las plantas, en consecuencia, han generado mecanismos que les aseguren crear una amplia gama de variantes en lapsos relativamente cortos pero que al mismo tiempo las puedan mantener. Debe existir entonces un compromiso entre variabilidad y estabilidad.

Dada la organización en *clusters* de la mayoría de los genes *R*, se han inferido varios mecanismos que les permiten a las plantas generar nuevas variantes dentro de las que se encuentran las duplicaciones en tándem (figura 14). En los loci de genes *R* complejos con múltiples repeticiones, la recombinación entre secuencias LRR de diferentes homólogos puede crear genes *R* con un número variable de repeticiones y en consecuencia con novedosas especificidades. También existe una alta variación intraespecífica producto del desigual *crossing over* dentro de los genes en el *cluster* (figura 14). A pesar de que algunos genes exhiben una alta variación intra e interespecífica, no presentan tasas elevadas de mutación o recombinación. Otros mecanismos genéticos para generar variantes no son especiales para los genes *R* e incluyen los clásicos eventos de desigual *crossing over*, intercambio de secuencias y conversión génica (figura 14). La tasa de evolución de los genes *R* puede ser rápida o lenta aun dentro de un *cluster* de genes o en genes con secuencias similares. En el caso de locus *Dm3* de lechuga, el cual contiene un número alto de secuencias CNL, se han observado dos patrones de evolución: los genes llamados de tipo I, que evolucionan rápidamente con frecuentes procesos de conversión génica entre ellos y los cuales están posiblemente implicados en el reconocimiento de elicitores que, a pesar de ser mutados, provocan poca penalidad en la patogenicidad del patógeno; y los genes de tipo II, que se caracterizan por poseer tasas de evolución muy lentas y quizás reconozcan elicitores que son importantes para las funciones del patógeno. El impacto de la selección sobre los dominios en el interior de los genes *R* es también bastante heterogéneo. El dominio NBS parece estar sujeto a selección purificadora y los eventos de conversión génica son poco frecuentes. Por el contrario, el dominio LRR es altamente variable y al menos una parte de él está sometida a selección diversificadora (ver capítulo VII.A.1). De manera similar, procesos, como el desigual *crossing over*, han permitido generar variación en el número de unidades repetitivas en el LRR. La comparación entre haplotipos *R* (composición alélica dentro de un *cluster* de genes *R*) ha revelado que los ortólogos (secuencias separadas por especiación y que ocupan las mismas posiciones alélicas dentro de un *cluster* de genes) son generalmente más similares entre ellos que los parálogos (secuencias duplicadas dentro del mismo *cluster*). Se ha sugerido que este tipo de fenómeno puede explicarse por el modelo de nacimiento y muerte (*birth and death*) durante la evolución de los genes *R* –como se ha postulado para la evolución de los genes

del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de vertebrados—. El proceso de nacimiento y muerte involucra la expansión o contracción del *cluster* (por duplicación o pérdida de genes). Este es un proceso en dos etapas; en la primera de ellas, el desigual *crossing over* genera la ganancia o pérdida de genes y, posteriormente, en la segunda, se da la evolución individual de los genes por selección diversificadora.



**Figura 14.** Mecanismos empleados por las plantas para generar nuevas variantes, con nuevas especificidades, de genes *R*. Los mecanismos evolutivos pueden variar entre diferentes especies vegetales y dependerán también del sistema de cruzamientos (polinización cruzada o autopolinización) así como de la organización de los genes en locos sencillos o loci complejos.

## G. EL CONCEPTO DE ARMS RACE

La importancia de los genes *R* está en su capacidad de proteger a las plantas de las infecciones ocasionadas por los patógenos, a través de su reconocimiento. Este es un proceso coevolutivo dinámico que involucra a los dos protagonistas: plantas y microorganismos. Durante muchos años se ha manejado el concepto de *arms race* el cual establece que la efectividad de un gen *R* se pierde por la mutación del gen *Avr* correspondiente presente en el patógeno. En consecuencia, deben generarse genes *R* con nuevas especificidades de resistencia. Sin embargo, esto es una simplificación ya que se ha demostrado que los genes *Avr* tienen una función positiva en la virulencia y que perderlos tiene un costo adaptativo para el patógeno. Se considera entonces más probable que los genes *R* y *Avr* se han mantenido en las poblaciones de plantas y patógenos, respectivamente, por largos periodos de tiempo mediante selección balanceadora y que la estrategia de perderlos no es el fenómeno más corriente. Estudios

sobre poblaciones naturales de patosistemas como *Linux marginale-M. lini* y *Senecio vulgaris-Erysiphe fisheri* han mostrado que dentro de una localidad existen plantas y patógenos con un alto grado de variación en resistencia y virulencia, respectivamente. Estos estudios probaron que no existían plantas que fuesen completamente resistentes a todos los patotipos del hongo y que fueron escasas las plantas con rangos amplios de resistencia. Respecto a los patógenos se encontró que aquellos que eran capaces de romper la resistencia eran los menos frecuentes. Los que podían romper la resistencia de unos pocos genes *R* fueron los más comunes. En el tiempo pueden existir fluctuaciones en las frecuencias de los diferentes genotipos en las poblaciones de patógenos y plantas, pero el nivel general de la enfermedad permanece constante, fenómeno conocido como “balance endémico”. Un modelo que permite explicar este balance recurre al concepto de metapoblaciones, las cuales están constituidas por micropoblaciones. Cada micropoblación puede ser susceptible a diferentes patotipos del patógeno a diferente nivel. En un momento determinado, una micropoblación puede estar sometida a una fuerte presión selectiva, ya que una cepa particular de un patógeno es capaz de infectarla, mientras que existirán simultáneamente otras micropoblaciones que no están sometidas a dicha presión selectiva. La micropoblación sometida a una fuerte presión selectiva producirá pocas semillas, lo que ocasionará que el patotipo que la infecta sea seleccionado en contra y, en consecuencia, serán otros los patotipos predominantes. En cualquier momento cada micropoblación estará en una fase particular de este proceso y así surgirá un balance general dentro de toda la metapoblación. En ambientes agrícolas productivos, en donde existen monocultivos genéticamente uniformes, estas relaciones coevolutivas se rompen y entonces allí opera el proceso de *arms race*.

## H. GENES *R* RECESIVOS

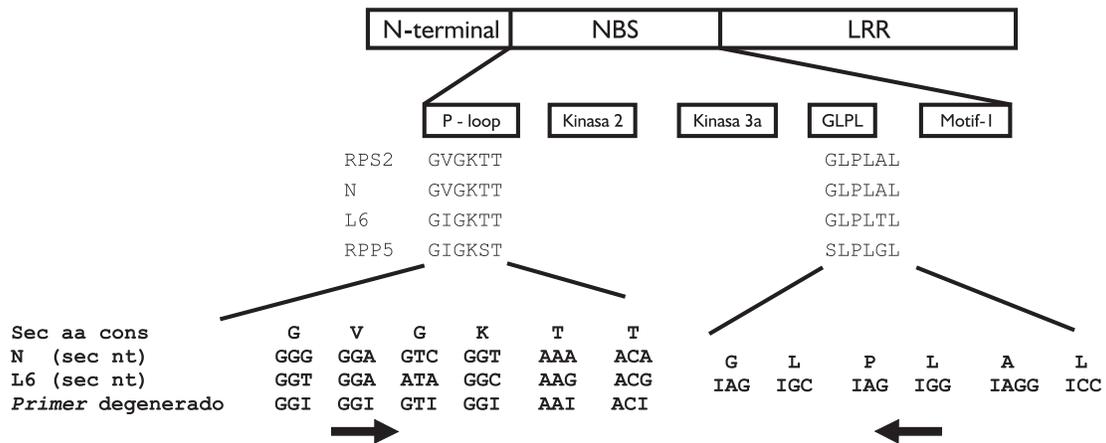
Aunque la mayoría de los genes *R* siguen el modelo gen por gen propuesto por Flor que establece que la resistencia está controlada por genes *R* dominantes, existen algunos casos en los cuales los genes *R* pueden ser recesivos. El carácter recesivo de estos genes ha hecho que sea más difícil su identificación y caracterización. El caso más conocido es el del gen *Mlo* de cebada, en el cual la resistencia monogénica es controlada por los alelos recesivos *mlo*. Otra característica particular de este gen es que confiere resistencia a un amplio espectro (prácticamente a todos los aislamientos) del mildew polvoso de cebada. La clonación de este gen se llevó a cabo mediante mapeo posicional y se logró determinar que el gen codifica para una proteína de 60 kDa, la cual está anclada a la membrana por siete hélices transmembranales. La proteína no tiene similitud con otras proteínas presentes en las bases de datos. Recientemente se ha demostrado que su actividad se incrementa a través de la interacción con calmodulinas dependientes de calcio. Se considera que la proteína MLO puede actuar como un regulador negativo de la respuesta de resistencia. Otro gen

que ya se ha discutido, y el cual es recesivo, es el *RRS1*. Al parecer, el alelo en el parental susceptible (*RRS1-S*) suprimiría las respuestas de defensa mediadas por *RRS1-R* y las dos proteínas competirían por factores necesarios para la percepción del patógeno. Los genes *R* de tipo recesivo se encuentran más comúnmente en aquellos que confieren resistencia a virus y particularmente al grupo de *Potyvirus*. El factor de iniciación de la traducción eIF4E ha sido identificado como un locus de resistencia a virus en plantas como lechuga, pimentón y frijol. La isoforma eIF(iso)4E también ha sido implicada en la resistencia de *Arabidopsis* y pimentón. El rol de este factor de iniciación en la resistencia o infección de los *Potyvirus* no se conoce. Recientemente se clonó y caracterizó el gen de resistencia *xa5* de arroz, el cual confiere resistencia contra cepas de *X. oryzae* pv. *oryzae* que contienen el gen *Avrxa5*. De manera interesante este gen es recesivo y mostró codificar para la subunidad  $\gamma$  del factor de transcripción IIA (TFIIA $\gamma$ ). El análisis de secuencia comparativo entre múltiples cultivares de arroz reveló que un cambio en un aminoácido se correlaciona con el fenotipo de resistencia/susceptibilidad. Este hecho ha llevado a postular que *xa5* y *Xa5* codifican isoformas de TFIIA $\gamma$  y que poseen diferentes afinidades por el dominio de activación transcripcional presente en la proteína AvrXa5. Se ha propuesto un modelo en el que AvrXa5 se une con TFIIA $\gamma$  para modular la expresión de genes para el beneficio del patógeno. Este modelo plantea además que AvrXa5 sería incapaz de unirse con la isoforma TFIIA $\gamma$  codificada por *xa5* en los cultivares resistentes.

## I. GENES R CANDIDATOS

La presencia de dominios conservados en las proteínas codificadas por los genes *R* no solo ha permitido agruparlos en clases y dar indicios sobre su función en el reconocimiento y activación de la transducción de señales, sino que también ha permitido la identificación de genes *R* candidatos (RGCs). Partiendo de la similitud entre genes *R*, se ha empleado exitosamente un método basado en PCR para aislar RGCs en una amplia gama de especies vegetales –método que emplea *primers* degenerados diseñados a partir de los dominios conservados–. Como se puede observar en la figura 15, la secuencia de aminoácidos en los motivos conservados presentes en el dominio NBS es altamente similar entre diferentes especies. La secuencia de nucleótidos que codifican para estos motivos es igualmente similar, pero los cambios corresponden básicamente a la tercera posición del codón. Debido a que el código genético es degenerado, estos cambios a nivel de nucleótidos no se traducen en cambios en el aminoácido. De esta manera, se pueden diseñar *primers* complementarios a estos motivos conservados en los cuales la tercera posición del codón es remplazada por una inosina, la cual es capaz de reconocer cualquiera de los cuatro nucleótidos (A, C, G o T) (figura 15). Así, aun sin conocer la secuencia de nucleótidos específica en los genes *R* de una especie vegetal, se podrá lograr amplificar el dominio conservado. Vale la pena destacar que a través de esta estrategia se

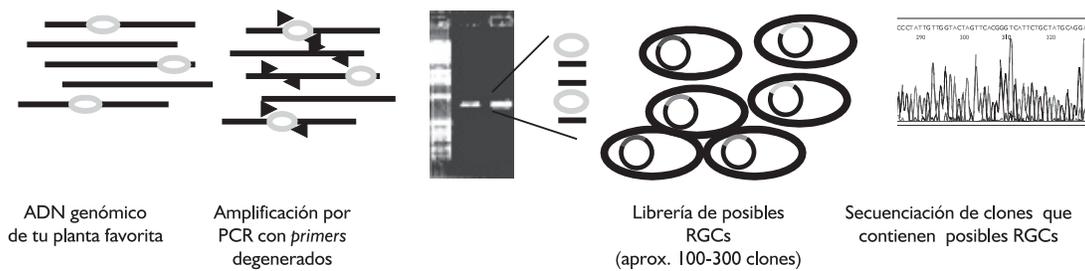
logra amplificar solamente la región correspondiente al dominio conservado y es necesario desarrollar posteriormente otro tipo de estrategias para identificar el gen completo.



**Figura 15.** Alineamiento de algunos motivos presentes en el dominio NBS en varios genes *R*. Se puede observar el alto grado de conservación en la secuencia de aminoácidos, mientras que la secuencia de nucleótidos cambia principalmente en la tercera posición del codón, lo que hace posible el diseño de *primers* degenerados. En la figura se muestra el *primer forward* y un *primer reverse*.

Los productos de PCR obtenidos deben purificarse e individualizarse por clonación, después de lo cual se pueden secuenciar (figura 16). Tres criterios deben cumplir las secuencias así obtenidas para ser consideradas como genes *R* candidatos: *i*) los análisis de secuencia deben confirmar la presencia de otros motivos conservados, adicionales a los que se emplearon para el diseño de los *primers*; *ii*) el mapeo debe mostrar que estas secuencias colocan con loci de resistencia o con QTLs asociados a la resistencia previamente caracterizados, y *iii*) finalmente se debe obtener la secuencia completa del gen y, por análisis de transformación, las plantas sensibles deben adquirir el fenotipo de resistencia.

Como se mencionó, este tipo de estrategia ha sido extensamente empleada para aislar RGCs de una gama de especies vegetales bastante amplia. Sin embargo, la mayoría de estudios se han focalizado sobre el empleo de *primers* diseñados a partir de los motivos conservados en el NBS, y son pocos los estudios que han empleado otros dominios, como el TIR, para el diseño de *primers* degenerados. En un capítulo anterior se mencionó también que a partir de la secuencia NBS se puede predecir con cierto grado de confianza si la proteína *R* que lo contiene posee un dominio TIR en su extremo N-terminal (capítulo VII.A.2). De igual manera pueden existir motivos dentro del NBS que están asociados con la presencia/ausencia del dominio TIR. Sobre esta base y conociendo la secuencia del dominio NBS, estos se pueden agrupar en tipo TIR y en tipo no-TIR.



**Figura 16.** Estrategia empleada para identificar RGCs. Posterior a la amplificación empleando *primers* degenerados, los amplicones se individualizan por clonación y clones al azar se seleccionan para secuenciar. Los análisis de secuencia deben revelar similitud con genes *R* previamente identificados y mostrar motivos adicionales a los empleados para el diseño de los *primers* y que están presentes en los otros genes *R*.

Se han llevado a cabo varios esfuerzos para amplificar, empleando la estrategia de *primers* degenerados, NBS de la clase TIR en pastos y otras monocotiledóneas, con resultados negativos. De igual manera, a pesar de que en las bases de datos de genes existe un gran número de secuencias de tipo NBS reportadas, en monocotiledóneas están ausentes las secuencias de tipo TNL. En cambio se ha logrado demostrar que las secuencias NBS de tipo TIR están presentes en todas las angiospermas. En *Pinus* ha sido posible identificar una secuencia de tipo TNL, lo que ha llevado a postular que el ancestro común de las angiospermas y gimnospermas contenía ambos tipos de secuencias y que, durante la evolución, las monocotiledóneas fueron perdiendo las secuencias de tipo TIR.

El alto número de secuencias de tipo NBS presentes en las bases de datos de dominio público, obtenidas la mayoría de ellas mediante PCR con *primers* degenerados, ha permitido realizar varios estudios filogenéticos. Estos análisis han sustentado también la división entre secuencias NBS de tipo TIR y de tipo no-TIR, y han permitido dar indicios sobre la diversidad y evolución de este tipo de secuencias. Independientemente de las especies en estudio, las secuencias de tipo TIR siempre forman un grupo filogenético separado de las secuencias de tipo no-TIR. Las secuencias no-TIR de las monocotiledóneas no forman un grupo monofilético con respecto a las dicotiledóneas, lo que da sustento a la hipótesis de que el ancestro común contenía múltiples secuencias de tipo no-TIR y que estas han divergido desde entonces. Se han obtenido árboles filogenéticos para secuencias TIR y no-TIR, y se ha observado que las longitudes de las ramas en el árbol de las secuencias no-TIR son más largas, indicando muy posiblemente que existe mayor restricción y presión selectiva sobre las secuencias TIR o que estas presentan mayores tasas de intercambio y homogenización.

El mapeo de los diferentes RGCs obtenidos en diferentes especies vegetales ha demostrado que la mayoría de ellos se encuentran formando *clusters* como lo hacen muchos de los genes *R*. Varios RGCs han sido localizados en regiones

donde existen genes *R*, e incluso uno de los RGCs obtenidos en *Arabidopsis* mostró que correspondía al gen de resistencia *RPS2*. Previamente se había postulado que los genes que gobiernan la resistencia cuantitativa podían mostrar similitudes estructurales con los genes *R* de resistencia cualitativa, lo que haría válido emplear la estrategia de *primers* degenerados para estudiar posibles asociaciones entre RGCs y QTLs. En los últimos años se ha demostrado que varios RGCs en frijol, arroz y yuca colocalizan con regiones genómicas en donde existen QTLs asociados a la resistencia, lo cual sustenta esta hipótesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analyses of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 769-815.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J. L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 391-9.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B. J. (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-60.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J. (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-14.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y. (2003) Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and *PopP2*, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8024-9.
- Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.
- Dinesh-Kumar, S. P., Tham, W. H., Baker, B. J. (2000) Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14789-94.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ellis, J. G. (2001) Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* 13: 163-78.
- Ellis, J. G., Lawrence, G. J., Luck, J. E., Dodds, P. N. (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell* 11: 495-506.
- Flor, H. H. (1955) Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.

- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M. et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5: 1003-11.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000). Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Gruissem and Jones Eds. Rockville.
- Hammond-Kosack, K. E., Parker, J. E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* 14: 177-93.
- Hulbert, S. H., Webb, C. A., Smith, S. M., Sun, Q. (2001) Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol.* 39: 285-312.
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J., Jones, J. D. G. (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fluvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-793
- Kanazin, V., Frederick Marek, L., Shoemaker, R. C. (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11746-11750.
- López, C. E., Acosta, I. F., Jara, C., Pedraza, F., Gaitán-Solís, E., Gallego, G., Beebe, S., Tohme, J. (2003) Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93: 88-95.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., Sessa, G. (2003) Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 54: 23-61.
- McDowell, J. M., Dhandaydham, M., Long, T. A., Aarts, M. G., Goff, S., Holub, E. B., Dangl, J.L. (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1861-74.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., Michelmore, R. W. (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.* 7: 212.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., Young, N. D. (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20: 317-332.

- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R. W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 809-34.
- Michelmore, R. W. (2003) The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* 6: 397-404.
- Ramonell, K. M., Somerville, S. (2002) The genomics parade of defense responses: to infinity and beyond. *Curr Opin Plant Biol* 5: 291-4.
- Staskawicz, B. J., Mudgett, M. B., Dangl, J. L., Galan, J. E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 292: 2285-2289.
- Tameling, W. I., Elzinga, S. D., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L., Haring, M. A., Cornelissen, B. J. (2002) The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14: 2929-39.
- Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., Turner, J. G. (2001) Broad spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* 291: 118-20.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Zhou, N., Tootle, T. L., Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* 11: 2419-28.

## VIII. GENES EFECTORES O AVR

El modelo gen por gen propuesto por Flor establece que la interacción entre planta y patógenos depende de los genes *R* y *Avr*, respectivamente (figura 7). Ya vimos las características de los genes *R* presentes en las plantas y su función. Ahora describiremos los otros responsables de la interacción: los genes *Avr* y las proteínas que ellos codifican.

El término genes *Avr* lo empleó Flor para describir las proteínas de los patógenos que interactuaban con las proteínas *R* de las plantas. En términos más generales se ha utilizado el concepto de elicitores o efectores para definir las proteínas producidas por los patógenos y que son “presentadas” a las células vegetales durante la infección. En este sentido podrían definirse como moléculas “antigénicas”. El término elicitador se usa principalmente en el caso de las relaciones de tipo no hospedero, en las cuales también se emplea el término MAMPs. Se denominan proteínas o genes *Avr* solamente cuando se ha establecido cuál es la proteína *R* capaz de reconocer o interactuar con el efector correspondiente. En este texto utilizaremos los términos efector o *Avr*, según corresponda. En el caso de las interacciones incompatibles, la función de los efectores es encender las respuestas de defensa, mientras que en interacciones compatibles su función es suprimir las respuestas de defensa basales (ver capítulo VIII.B.6).

Los genes de patogenicidad se requieren para que el patógeno cause enfermedad en las plantas. Las proteínas codificadas por los genes *Avr*, una vez reconocidas por las proteínas *R*, permiten la activación de la RH e inhiben el posterior desarrollo de la enfermedad, independientemente de si estos *Avr* son factores de patogenicidad. Un gen de patogenicidad puede convertirse en un gen *Avr*, si su producto es reconocido por el sistema de defensa de la planta.

### A. GENES EFECTORES O AVR EN VIRUS

Los efectores en virus se han identificado mediante la creación de clones quiméricos derivados de genotipos virales con niveles de virulencia contrastantes y evaluando la capacidad de infección de estos clones quiméricos. Una vez que un gen ha sido identificado como un efector candidato, estudios de mutagénesis sitio-dirigida permiten la identificación específica de la región responsable de la virulencia. En el caso de los virus que poseen genomas muy pequeños, cualquier parte de su genoma puede constituirse virtualmente en un potencial efector. Genes que codifican la replicasa, la proteína de movimiento y la proteína de la cápside han sido reportados como genes *Avr*. Estos genes se requieren además para la propagación y movimiento del virus y son entonces también genes de patogenicidad. Debido a que estas proteínas son necesarias para las funciones vitales de los virus, estos han desarrollado estrategias que les permiten introdu-

cir cambios en sus aminoácidos, de tal forma que escapen del reconocimiento por parte de las plantas sin ocasionar una pérdida de su función. En el caso de la resistencia mediada por genes recesivos, la mayoría de los genes efectores corresponde a VPg. VPg codifica una proteína que se une al extremo 5' del ARN viral, mimetizando quizás el m<sup>7</sup>G cap de los ARNm eucarióticos.

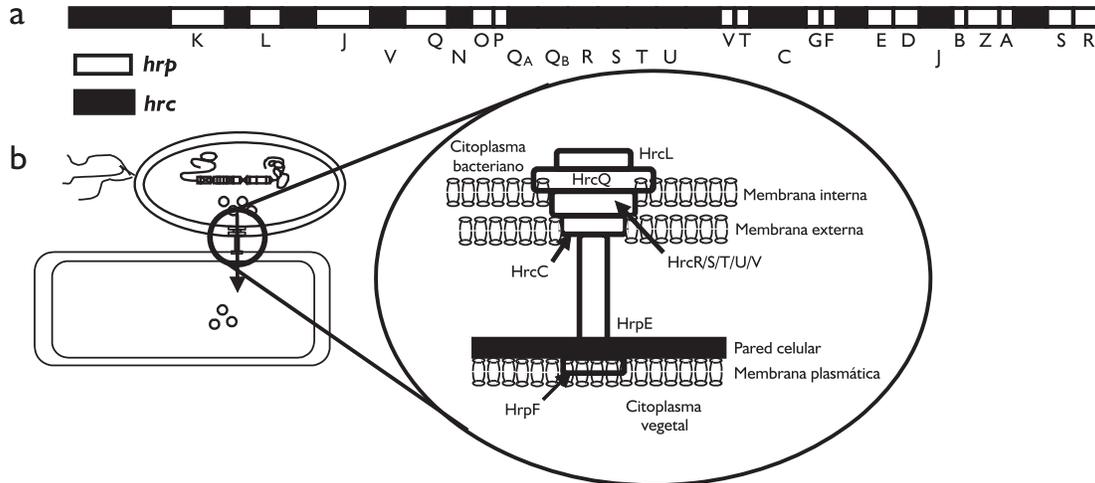
## **B. GENES EFECTORES O AVR EN BACTERIAS**

### **I. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO 3 (T3SS)**

Las bacterias fitopatógenas Gram-negativas han desarrollado mecanismos sofisticados para alcanzar los nutrientes del interior de las células vegetales. Una vez que las bacterias se encuentran cerca de las células vegetales, liberan una serie de proteínas efectoras dentro del citosol de las células. La liberación de estas proteínas efectoras es mediada por el sistema de secreción tipo 3 (T3SS) (figura 17). El T3SS es importante para bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* y *Pantoea* que colonizan los espacios intercelulares (apoplasto) de las plantas. El T3SS también está presente en bacterias patógenas de animales en las cuales cumple también la función de secretar proteínas de virulencia. El T3SS está formado por un complejo multiproteico que configura una estructura de tipo jeringa y permite conectar la célula bacteriana con la membrana de las células infectadas (figura 17). En un proceso dependiente de ATP, el T3SS permite el transporte de los efectores al interior de las células. Los componentes del T3SS se conservan entre bacterias Gram-negativas, pero los efectores que ellos transportan son estructuralmente muy diferentes. Se pueden definir dos tipos de transporte mediados por el T3SS: la secreción y la translocación. La secreción hace referencia al transporte de los efectores bacterianos desde la célula bacteriana al medio extracelular. La translocación implica la entrada de los efectores dentro del citoplasma de la célula vegetal. Es posible que los mecanismos de secreción y translocación sean diferentes, pero se desconoce cuáles son los factores que regulan uno u otro y si la arquitectura de T3SS cumple una función en estas diferencias. La secreción de algunas proteínas puede ocurrir no solo a través del T3SS, sino también a partir del flagelo, mientras que la translocación es absolutamente dependiente del T3SS. Algunas proteínas efectoras solo son secretadas (hrpN) y otras son translocadas (la mayoría de Avr).

El T3SS está formado por aproximadamente 20-25 proteínas, de las cuales cerca de la mitad son muy conservadas entre diferentes especies (figura 17). Algunas de las proteínas que conforman el T3SS son similares también a las proteínas que constituyen el cuerpo basal del flagelo, lo que ha llevado a sugerir que el T3SS evolucionó a partir del flagelo a través de la duplicación de los genes que codifican para ciertas proteínas del flagelo. A partir de la duplicación, cada uno de los genes habría evolucionado independientemente. Otra hipótesis

sugiere que el T3SS es tan ancestral como el flagelo y que comparten un ancestro común. La estructura del T3SS se parece al cuerpo basal del flagelo, el cual consiste en dos anillos externos que interactúan con la membrana externa de la bacteria, dos anillos internos que interactúan con la membrana citoplasmática y una extensión tipo jeringa que puede tener aproximadamente 8 nm de diámetro y 80 nm de longitud.



**Figura 17.** Genes y estructura del T3SS presentes en bacterias fitopatógenas. En a se muestra la organización en un *cluster* de varios de los genes que codifican para el T3SS. Los genes *hrp* y *hrc* son diferenciados. b. Representación esquemática del T3SS, el cual es un complejo proteico que forma una estructura tipo jeringa que atraviesa las dos membranas de la bacteria y se conecta con el citoplasma de la célula vegetal.

Las proteínas efectoras alcanzan el citoplasma de las células infectadas a través de poros en las membranas, los cuales son formados por proteínas translocadoras que han sido principalmente estudiadas en *Yersinia*, una bacteria que infecta humanos. Uno de los principales translocadores en ser identificado fue HrpF de *Xanthomonas*.

La estructura del T3SS es altamente conservada entre bacterias que infectan mamíferos y bacterias fitopatógenas. Sin embargo, los componentes extracelulares del T3SS son más variables y especializados en bacterias fitopatógenas, dado que ellas deben superar una barrera estructural adicional que es la pared celular de las células vegetales. Dentro de los componentes particulares del T3SS en bacterias fitopatógenas se encuentran el hrp-pilus y los harpins. El hrp-pilus es un apéndice proteináceo largo (2  $\mu$ m) codificado por *hrpA* en *Pseudomonas* y *hrpY* en *Ralstonia*. Bacterias mutantes en estos genes son aún capaces de unirse a las células vegetales, pero son deficientes en secretar efectores y no son patógenas. Se ha sugerido que la larga estructura del hrp-pilus puede permitir que los efectores logren superar la barrera que representa la pared celular. Los

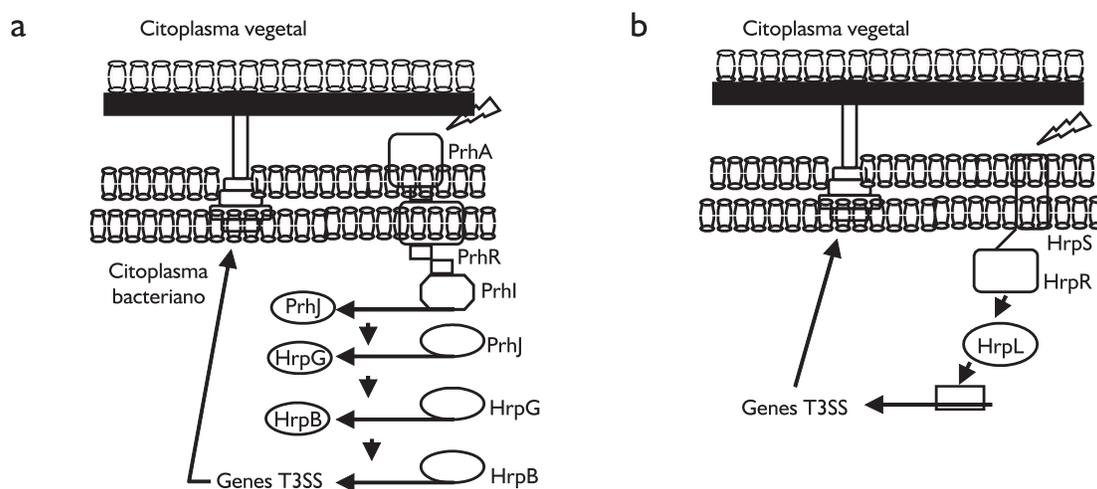
harpins no tienen un rol importante en el transporte de los efectores, pero sí se ha demostrado que son capaces de elicitar las respuestas de defensa vegetales. Los harpins difieren de las otras proteínas que son translocadas por el T3SS en que son proteínas ricas en glicina, no poseen cisteínas y tienen una actividad elicitora de la RH estable al choque térmico cuando son infiltradas a altas concentraciones en el apoplasto de las hojas de varias especies vegetales sin necesitar ser interiorizadas en el citoplasma para encender la RH. Los harpins han sido reportados en todas las bacterias fitopatógenas. En *Xanthomonas* se encuentra la familia *Hpa1/HpaG*. Las bacterias *P. syringae* y *Erwinia amylovora* producen dos tipos de harpins cada una: HrpZ/HrpW y HarpN/HrpW, respectivamente. En el caso de HrpW se ha evidenciado la presencia de un dominio C-terminal que muestra similitudes con pectato liasas; esto sugiere que su sitio de acción es la pared celular de las células vegetales. Los estudios con HrpN han mostrado que la RH elicitada por este harpin es dependiente del ácido salicílico (AS) y de los genes *NPR1*, *NDR1* y *EDS1* (ver capítulo X), lo que sugiere que las respuestas elicitadas por harpins siguen las mismas vías de transducción de señales que las que son activadas por efectores de tipo Avr.

El T3SS en bacterias fitopatógenas está codificado por un grupo de genes llamados *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) (figura 17). Los genes *hrp* se descubrieron al identificar mutantes bacterianos que perdieron simultáneamente la capacidad de desencadenar la enfermedad y elicitar la RH. Varios de los genes *hrp* se conservan con los genes que codifican el T3SS en bacterias que infectan animales y han sido denominados *hrc* (*hrp conserved*) (figura 17). Los genes *hrp* forman un *cluster* (excepto en *Ralstonia*), el cual muestra características típicas de islas de patogenicidad, tales como la presencia de factores de virulencia, elementos genéticos móviles y genes de ARNt en los extremos y un contenido de GC diferente al del resto del genoma. Se ha sugerido que estas islas de patogenicidad han sido adquiridas por transferencia génica horizontal. Los genes *hrp* pueden ubicarse en una sola región dentro del cromosoma bacteriano o en plásmidos (*Ralstonia* y *Pantoea*). Las secuencias que flanquean el *cluster hrp* varían en su contenido de genes y frecuentemente poseen genes efectores. El grado de conservación de la función de este tipo de transporte se demostró al introducir de manera simultánea el *cluster* de genes *hrp* en la bacteria no patogénica *E. coli* junto con un gen *Avr*, y se observó que esto permitía a la bacteria inducir una RH en la planta apropiada. De manera similar, se demostró que el T3SS de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* es capaz de secretar las proteínas PopA de *R. solanacearum*, AvrB de *P. syringae* y YopE de *Yersinia pseudotuberculosis*, lo que indica que las propiedades de secreción se conservan entre bacterias patógenas de animales y plantas.

La expresión de los genes del T3SS es inducida *in planta* o por medios mínimos específicos que simulan el fluido apoplástico. Los mecanismos de regulación de la expresión de los genes *hrp* se clasifican en dos grupos. El grupo I com-

prende las especies *Erwinia*, *Pantoea* y *P. syringae*, mientras que *Xanthomonas* y *Ralstonia* pertenecen al grupo II. La expresión de los genes *hrp* del grupo I depende de HrpL, que es un activador que pertenece a la familia de factores sigma, el cual se une a la secuencia conservada (GGAACC-N<sub>15</sub>-CCACTAT) llamada caja *hrp*. Esta caja se encuentra en el operón *hrp* de ciertos genes efectores que son corregulados. La expresión de HrpL es controlada por HrpR y HrpS en *P. syringae* y por HrpS, HrpX y HrpY en *Erwinia* y *Pantoea*. *hrpX* y *hrpY* codifican un sistema regulador de dos componentes. HrpX es la proteína sensora, posee un dominio PAS en el extremo N-terminal y un dominio histidina kinasa en el extremo C-terminal. El dominio PAS se conserva altamente entre bacterias y parece ser el responsable de percibir las señales ambientales. HrpY posee la función de activación de la transcripción del gen *hrpL* (figura 18).

La expresión de los genes *hrp* del grupo II ha sido más estudiada en *Ralstonia*, donde un receptor de membrana, PrhA, percibe una señal ambiental. La percepción de dicha señal permite la activación de PrhR y PrhI. PrhR es presumiblemente una proteína transmembranal y PrhI es un factor sigma. La activación de PrhI induce la expresión de los genes reguladores *PrhJ*, *HrpG* y *HrpB*. El homólogo de HrpB en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* es *HrpX*. La activación de los genes por HrpB depende de la presencia en el promotor de la caja *hrpI* (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) (figura 18).



**Figura 18.** Representación del mecanismo de regulación de la expresión de los genes *hrp* en bacterias fitopatógenas. a. Sistema de regulación en *Ralstonia*. b. Sistema de regulación en *Pseudomonas syringae*.

En *Xanthomonas*, HrpG y HrpX son codificados por genes que se encuentran fuera del *cluster hrp*. HrpG controla la expresión de *HrpX*, el cual a su vez regula la expresión de muchos genes dentro del regulón *hrpG* incluyendo los

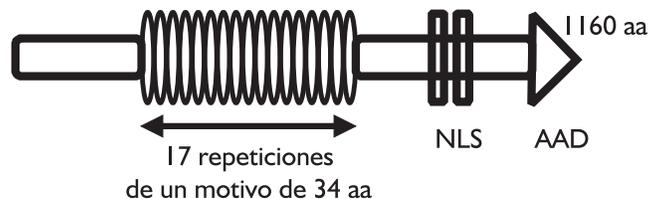
operones que van desde *hrpB* hasta *hrpF*. Muchos de los genes regulados por HrpX contienen una caja PIP (Plant-Inducible Promotor) en el promotor cuya secuencia consenso es TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC. Sin embargo, la presencia de la caja PIP no es un criterio diagnóstico para definir genes regulados por HrpX. Algunos genes que poseen promotores con la caja PIP no son inducidos por HrpX; esto sugiere que deben existir otros elementos importantes en el promotor y otros factores reguladores aún no identificados.

## 2. LA FAMILIA AVRBS3

Los efectores son moléculas que se transportan a través del T3SS. Los efectores mejor estudiados son las proteínas Avr porque son reconocidas por las proteínas R presentes en las plantas. Otros efectores también han sido identificados y designados como Hop (*Hrp outer protein*) en *Pseudomonas*, Xop (*Xanthomonas outer protein*) en *Xanthomonas* o Pop (*Pseudomonas outer protein*, basado en la designación previa de este género) en *Ralstonia*. Desde 1984 ha sido posible clonar y caracterizar los genes Avr de bacterias. Actualmente existen más de 150 genes Avr clonados de un amplio rango de cepas de bacterias fitopatógenicas. Los genes Avr bacterianos no presentan ningún tipo de similitud entre ellos, a excepción de la familia *AvrBs3*, y generalmente codifican proteínas hidrofílicas que carecen de péptidos señal.

El gen *AvrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) fue el primer miembro de la familia de genes *AvrBs3* que se identificó y es el que define a los miembros de esta familia (figura 19). *AvrBs3* es reconocido específicamente por el producto del gen *Bs3* de pimentón. Actualmente existen más de 40 genes de la familia *AvrBs3* identificados en diferentes especies de *Xanthomonas* y en *Ralstonia*. Los genes de tipo *AvrBs3* son los genes Avr más extensamente estudiados. La característica más importante de los miembros de la familia *AvrBs3* es que presentan un dominio repetido casi idéntico de 34 aminoácidos, en el cual el número de las unidades repetitivas puede variar de 5,5 a 25,5 según la proteína (figura 19). Solo dos miembros de esta familia (Brg11 de *Ralstonia* y Hax2 de *X. campestris* pv. *armoraciae*) presentan unidades repetitivas de 35 aminoácidos producto de la inserción de una prolina entre las posiciones 32 y 33. Dentro de las unidades repetitivas los principales sitios variables se encuentran en las posiciones 4, 12, 13 y 24, en los cuales puede haber cambios de aminoácidos o incluso deleciones de un aminoácido. Se ha sugerido que este dominio de unidades repetitivas conforma una estructura terciaria en superhélice  $\alpha$ - $\alpha$  conocida como dominio tetratricopéptido (TPR, *tetratricopeptide repeat*). El dominio TPR permite la dimerización de *AvrBs3* y tal vez el ensamblaje de complejos multiproteicos dentro de la célula vegetal. El porcentaje de similitud entre las proteínas *AvrBs3* de *Xanthomonas* es de 80%-97%, lo cual es bastante alto. Los análisis de deleciones y la combinación de las unidades dentro del dominio repetido de diferentes proteínas *AvrBs3* han permitido demostrar que

la especificidad en virulencia y avirulencia está determinada por las unidades repetitivas. La proteína AvrBs3 posee en su extremo N-terminal una región de 50 aminoácidos portadora de la señal de secreción y translocación por el sistema T3SS, y además es responsable de la interacción con proteínas chaperonas de la bacteria (ver más adelante). La región C-terminal de muchos miembros de la familia AvrBs3 posee tres dominios adicionales: un motivo de cremallera de leucina (LZ, *leucine zipper*) implicado posiblemente en la formación de heterodímeros con factores de la planta; y dos señales de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signals*) que le permiten ser reconocida por proteínas de la planta (ver más adelante) para ser llevada al núcleo de la célula vegetal. Los miembros de la familia AvrBs3 poseen además un dominio de activación transcripcional ácido (AAD, *acidic activation domain*) que podría estar implicado directa o indirectamente en la unión a promotores de genes nucleares (figura 19). Los NLS permiten el tráfico de las proteínas del citoplasma al núcleo. Experimentos de doble híbrido en levadura permitieron identificar que AvrBs3 interactúa con las  $\alpha$ -importinas de pimentón mediante el NLS. La formación de este complejo proteico hace posible el paso de la proteína a través del complejo del poro nuclear. Estudios de mutaciones en los NLS y AAD de AvrBs3, AvrXa10 y AvrXa7 han mostrado que estos dominios son necesarios para el transporte al núcleo y para la activación de las respuestas de defensa mediada por los genes *R* correspondientes. Estos resultados demuestran que los miembros de la familia AvrBs3 reclutan la maquinaria de importe nuclear de la célula hospedera y que actuarían directa o indirectamente como factores transcripcionales, lo que permitiría modular el transcriptoma de la célula vegetal para inducir o reprimir genes en beneficio de la bacteria.



**Figura 19.** Representación de la estructura de una proteína de la familia AvrBs3 presente en *Xanthomonas*. Se muestra el motivo de 34 aminoácidos repetidos varias veces así como los dominios NLS y AAD.

Existen otros efectores que, si bien forman familias, no son muy numerosos y el grado de conservación no es tan alto como el de la familia AvrBs3. La familia de efectores AvrRxv/YopJ es una clase de efectores bien conservada entre patógenos de plantas y mamíferos. AvrRxv de *Xcv* y YopJ de *Yersinia pseudotuberculosis* fueron los primeros miembros de esta familia en ser aislados. Otros miembros de esta familia son AvrBsT, AvrXv4, aislados de *Xcv*, y AvrPpiG, de *P. syringae*.

### 3. ¿DÓNDE ESTÁ LA SEÑAL DE SECRECIÓN?

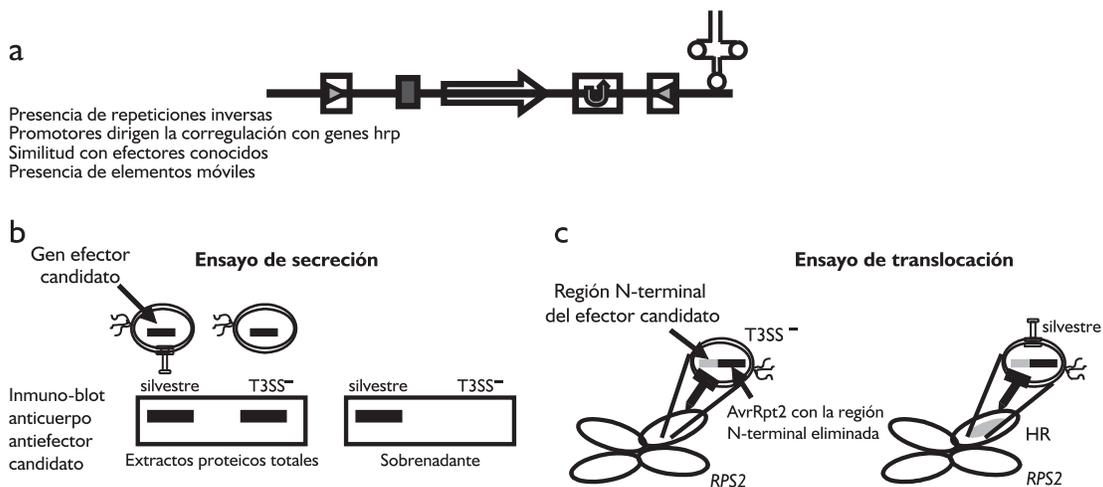
Las proteínas efectoras que viajan por el T3SS no poseen ningún tipo de péptido señal. La señal o características que les permiten a estas proteínas ser secretadas por el T3SS han permanecido como un enigma por mucho tiempo; sin embargo, recientemente se ha establecido que, para la mayoría de los efectores de *Pseudomonas*, los primeros 50 aminoácidos son suficientes para dirigir su secreción y translocación. Las características de esta región N-terminal son: *i*) la presencia de aminoácidos hidrofílicos, *ii*) la ausencia de residuos ácidos en los primeros 12 aminoácidos, *iii*) una mayor presencia de serinas y glutaminas, *iv*) poseer exclusivamente aminoácidos de tipo hidrófobo en la 3ª y 4ª posiciones y *v*) ser ricos en aminoácidos Ser y Pro en las 50 primeras posiciones.

Se ha sugerido también que quizás una molécula de ARNm podría constituirse en una señal, pero dicha hipótesis no ha sido claramente verificada. Además de las señales de secreción y translocación, varias proteínas efectoras poseen un sitio de unión a proteínas chaperonas del tipo T3S (T3Cs). Las T3Cs son pequeñas proteínas, típicamente ácidas, ricas en leucinas y con poco nivel de similitud entre ellas. Las T3Cs parecen jugar un papel importante al unirse a los efectores evitando su plegamiento, lo que facilita el paso a través del hrp-pilus. Las T3Cs suelen dividirse en diferentes categorías. Las de la clase IA se asocian específicamente con un solo efector y sus genes están usualmente cerca de los genes del efector con el que interactúan. Las T3Cs de la clase 1B se asocian con múltiples efectores, y son codificadas por genes que están dentro del *cluster* de los genes *hrp*. Las de la clase II asisten en la secreción de translocadores (proteínas que ayudan a los efectores a cruzar la membrana plasmática eucariótica). Las T3Cs de la clase III se utilizan en la biogénesis del T3SS flagelar. La función de las T3Cs se ha demostrado en *Erwinia* (DspB), en *Xcv* (HpaB) y en *P. syringae* (ShC, ShcF, ShcM, ShcN y ShcV).

### 4. IDENTIFICACIÓN DE EFECTORES

Mientras que las mutaciones en los genes del T3SS provocan la pérdida de la patogenicidad, las mutaciones individuales en los genes que codifican los efectores tienen poco o ningún efecto sobre la patogenicidad, lo que indica la importancia colectiva de los efectores en la patogénesis y la redundancia de ellos. Este hecho dificulta la identificación de efectores a través de análisis de mutantes con pérdida de función. Históricamente, mediante ensayos de avirulencia/virulencia sobre plantas que poseen genes de *R*, fue posible identificar las primeras proteínas Avr. En este caso, clones obtenidos de librerías genómicas construidas a partir de una cepa avirulenta son introducidos en bacterias virulentas, y la reversión del fenotipo revelado por la RH sobre plantas infectadas indica que el inserto dentro de dicho clon corresponde a un gen Avr.

Con la secuenciación de genomas enteros de las bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Psy*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Ralstonia solanacearum*, ha sido posible identificar efectores candidatos de una manera rápida. La identificación de efectores a nivel genómico se ha basado en la actividad del promotor *Hrp*, en la construcción de proteínas de fusión con genes reporteros o la búsqueda de patrones conservados a nivel de secuencia presentes en los promotores *Hrp* y en los dominios que dirigen las proteínas efectoras al T3SS (figura 20).



**Figura 20.** Estrategias para la identificación de efectores. En a se muestran las características presentes en muchos de los clusters en donde se pueden encontrar genes efectoras y las cuales han sido empleadas como criterios para la búsqueda de efectores a través de herramientas bioinformáticas en el genoma de organismos cuya secuencia está disponible. b. Confirmación experimental de la secreción de un efector candidato. c. Ensayo para determinar la translocación de una proteína efectora candidata.

Con base en la coregulación de los genes efectoras y *hrp* mediante *hrpL* en *Pseudomonas* es posible identificar efectores candidatos a partir de su inducción por *hrpL*. Así, por ejemplo, mediante librerías genómicas de *Pseudomonas* fusionadas con el gen GFP y empleando la expresión inducida de *hrpL* fue posible mediante FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) identificar genes regulados por *hrpL*. Dado que el mecanismo de regulación para los genes efectoras y *hrp* en *Xanthomonas* es más complicado, se han llevado a cabo otro tipo de estrategias como el uso de ADNc-AFLP. Empleando esta estrategia, fue posible identificar miembros del regulón *HrpG* en *Xcv*, el cual incluye cuatro genes efectoras (*xopA*, *xopB*, *xopC* y *xopJ*) que, como posteriormente se demostró, eran secretados por el T3SS. La coregulación de la expresión de los genes efectoras con genes *hrp* implica la presencia de elementos conservados en los

promotores de estos genes. Con la disponibilidad de la secuencia completa de genomas de varias bacterias fitopatógenas ha sido posible el desarrollo de algoritmos y programas bioinformáticos que permiten identificar estos promotores. De esta forma, los genes adyacentes a los promotores así identificados se constituyen en efectores candidatos. El análisis bioinformático de la presencia de promotores regulados por HrpL en el genoma de *Pseudomonas* permitió identificar 48 promotores Hrp. Sin embargo, este estudio reveló las limitaciones de este tipo de estrategia por cuanto algunos genes que poseían promotores Hrp codificaban proteínas de la biosíntesis de proteínas o factores reguladores y no constituyen buenos efectores candidatos. Algunos genes conocidos por ser *Avr* no presentaban promotores Hrp y muchos de los ORFs adyacentes a la secuencia promotora Hrp codificaban para proteínas desconocidas.

En *Ralstonia*, la expresión de genes *hrp* y efectores que son translocados por el T3SS es regulada de manera coordinada por HrpB. A partir de los genes *hrpY* y *popABC*, cuya expresión es regulada por HrpB, se pudo identificar la secuencia promotora, que consiste en 25 pb, la cual se denominó *hrp<sub>II</sub>* box (TTCGn16TTCG). Este tipo de secuencia está presente también en otros promotores de genes *hrp*. La búsqueda de esta secuencia promotora en la secuencia del genoma completo de *Ralstonia* permitió la identificación de 114 genes, los cuales se constituyen en genes efectores candidatos regulados por HrpB. La búsqueda de cajas PIP se ha efectuado también en los genomas de varias especies de *Xanthomonas*. Sin embargo, por el hecho de que la mayoría de los genes *Avr* en *Xanthomonas* pertenezca a la familia *AvrBs3*, la identificación de genes efectores candidatos en este grupo de bacterias se ha llevado a cabo principalmente a través de la búsqueda de ORFs que presenten similitud con miembros de esta familia. La presencia de características propias en la región N-terminal de los efectores de *Pseudomonas* (capítulo VIII.B.3) ha sido utilizada como criterio para buscar *in silico* en el genoma genes efectores candidatos. El empleo de estos patrones junto con la identificación de secuencias promotoras Hrp y bajo contenido de GC han permitido encontrar bioinformáticamente efectores candidatos en el genoma de *Pseudomonas*. Sin embargo, este tipo de características no está presente en los efectores de *Xanthomonas* ni de *Ralstonia*, por lo que se hace necesario emplear otro tipo de estrategias para la identificación de efectores en estas bacterias.

La identificación *in silico* de efectores candidatos ha permitido tener una idea general del repertorio de posibles efectores presentes en el genoma de bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas*, *Ralstonia* o *Xanthomonas*. Sin embargo, esto es solo un primer paso hacia la caracterización de efectores. El gran desafío actual es la validación de la función de los efectores candidatos sobre la base de su secreción/translocación por el T3SS. Para evaluar si un efector es realmente secretado/translocado por el T3SS, son varias las estrategias que se han empleado (figura 20). Para demostrar la secreción dependiente del T3SS,

cada uno de los genes efectores candidatos es introducido dentro de bacterias que son mutantes en el gen *hrcC* y en bacterias silvestres. Bacterias mutantes en el gen *hrcC* son incapaces de formar un T3SS funcional y no son capaces de introducir efectores en las células vegetales.

La detección de la proteína candidata se evalúa por Western-blot sobre extractos proteicos totales de las bacterias y en el sobrenadante (proteínas secretadas). Si la proteína es detectada en el sobrenadante del medio de cultivo de las bacterias silvestres y está ausente en el sobrenadante de las bacterias *hrcC* mutadas, se concluye que la proteína es secretada y que su secreción depende del T3SS (figura 20). Para evaluar in vivo la translocación de la proteína en el interior del citoplasma se han empleado proteínas reporteras. La primera estrategia se basa en la detección de la RH en plantas de *Arabidopsis* mediada por la interacción entre AvrRpt2 y RPS2. La región N-terminal de la proteína candidata es introducida en fusión con la secuencia del gen *AvrRpt2* a la cual se le ha eliminado la región N-terminal que contiene la señal de translocación. Este vector es introducido en bacterias *hrcC* mutantes y silvestres, las cuales se inoculan en plantas de *Arabidopsis* que contienen el gen *RPS2*. Si las bacterias silvestres son capaces de elicitar una RH en contraste a las cepas *hrcC* mutantes que son incapaces de hacerlo, se concluye que la proteína candidata fusionada a *AvrRpt2* posee la señal de translocación, que ha sido introducida al citoplasma de la célula vegetal por el T3SS y que ha permitido elicitar la RH, características propias de los efectores, confirmando así su función (figura 20).

Recientemente se desarrolló un sistema bioquímico para detectar la translocación. La estrategia consiste en fusionar el gen correspondiente al efector candidato con la secuencia codificante para el dominio adenilato ciclasa dependiente de calmodulina (*CyA*) proveniente de *Bordetella pertussis*. Las plantas son infectadas con bacterias que poseen esta proteína híbrido y, al cabo de un cierto tiempo, las hojas se colectan y se evalúa la actividad enzimática de la adenilato ciclasa en las células vegetales. Si la proteína candidata es translocada en el interior de la célula vegetal por el T3SS, se acoplará con la calmodulina presente únicamente en el citoplasma de las células eucariotas y tendrá una actividad adenilato ciclasa mayor, confirmando así la translocación. Este tipo de experimentos han sido empleados para la validación a gran escala de la función de los efectores candidatos identificados por análisis bioinformáticos tanto en *Pseudomonas* como en *Ralstonia* y más recientemente en *Xanthomonas* y *Erwinia*. Empleando este tipo de estrategias, se han identificado cientos de genes efectores candidatos en bacterias fitopatógenas y que una cepa particular puede contener aproximadamente 40-50 efectores.

La identificación de efectores en los genomas de estas bacterias ha permitido realizar análisis comparativos y demostrar, por ejemplo, que 17 de los

efectores candidatos identificados en *Pseudomonas* se conservan en *Ralstonia* y diez en *Xcc* y *Xac*. Cuatro efectores se conservan en *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Xanthomonas*, lo que sugiere que algunos mecanismos que facilitan la translocación a través del T3SS pueden conservarse. También ha sido posible asociar la presencia/ausencia de ciertos efectores con los estilos de infección de las bacterias. Así, por ejemplo, se encontró que *Xcc* (un patógeno que invade los vasos del xilema de crucíferas) no posee genes de tipo *AvrBs3*, mientras que *Xac* (un patógeno de cítricos que crece en el mesófilo) sí los tiene.

## 5. ESTRUCTURA DE LOS EFECTORES

A pesar de los grandes esfuerzos por dilucidar la función bioquímica de los efectores, son pocas las evidencias que han permitido asignarle un rol a este tipo de proteínas. Recientemente ha sido posible determinar la estructura tridimensional de algunos efectores, lo que ha dado algunas luces sobre su mecanismo en la manipulación de las vías de defensa de las plantas. La primera estructura cristalina que se obtuvo fue la de *AvrPphB* de *Pseudomonas*, la cual mostró similitudes con cisteín-proteasas de tipo papaína; su estructura es similar a *YopT*, a pesar de no compartir similitudes a nivel de secuencia. La estructura de esta proteína sugiere un mecanismo catalítico común en este tipo de proteasas. El clivaje específico de *PBS1* que lleva a cabo *AvrPphB* parece estar determinado por el plegamiento singular de esta proteína.

*AvrB* es una proteína de *Pseudomonas* que es reconocida por *RIN4*, una proteína de *Arabidopsis* (ver capítulo IX). Este reconocimiento provoca la fosforilación de *RIN4*, lo que sugiere que *AvrB* es una proteína kinasa. Sin embargo, *AvrB* no presenta similitudes con proteínas kinasas conocidas. La determinación de la estructura de *AvrB* reveló un nuevo tipo de plegamiento consistente en dos lóbulos, uno mayor que el otro. El lóbulo mayor presenta varios aminoácidos expuestos al solvente y se conserva entre homólogos de *AvrB*, lo que sugiere que este lóbulo podría incluir el sitio catalítico para la unión con un sustrato o con un cofactor. El lóbulo menor parece ser el responsable del reconocimiento por *RPM1*. La caracterización tridimensional de *AvrB* en el complejo proteico con *RIN4* y otras proteínas de la planta permitiría definir más claramente la función bioquímica de este efector.

La estructura de *AvrPto* se determinó por Resonancia Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), lo cual permitió establecer que *AvrPto* adopta dos conformaciones que se presentan de forma alternada cada 0,3 segundos. Esto parece indicar que pequeñas diferencias energéticas permiten el cambio en estos dos estados conformacionales que podrían ser importantes para el paso de *AvrPto* a través del T3SS. Este mismo estudio logró determinar que la secuencia "GINP" entre los aminoácidos 95 a 98 es necesario para el reconocimiento por *Pto*.

El gen *AvrPphF* consiste en dos ORFs que codifican ShcF y HopF1, una chaperona y un efector, respectivamente. La estructura tridimensional de ShcF y HopF1 reveló que ShcF efectivamente presenta una estructura similar a otras chaperonas; sin embargo, la estructura de HopF1 no presenta similitudes con plegamientos de otras proteínas. HopF1 forma una estructura tipo champiñón que puede subdividirse en dos dominios: una “cabeza” y un “tallo”. Por análisis de mutantes se logró identificar varios aminoácidos que son importantes para la virulencia; posiblemente representan sitios catalíticos para alguna actividad enzimática aún no establecida o para su interacción con proteínas de la célula vegetal.

Si bien la determinación de la estructura de estos efectores da indicios sobre las regiones implicadas en la interacción con otras proteínas o de su función, será necesario obtener la estructura tridimensional de los efectores en los complejos proteicos que ellos forman con las proteínas del hospedero, para tener una mejor visión de la relación entre estructura y función.

## 6. FUNCIÓN

¿Cuál es la función de los aproximadamente 40 efectores que puede contener un patógeno? ¿Cómo es que estos efectores logran alterar la fisiología y la bioquímica de una célula vegetal durante el proceso infectivo? La función atribuida desde ya hace varios años para los efectores, en el caso de una reacción incompatible, es ser reconocidos por las proteínas R de las plantas (genes *Avr*). Desde el punto de vista de una bacteria fitopatogena, poseer genes que le permitan ser reconocida por las plantas constituye una desventaja, por lo cual se ha sugerido que los efectores deben poseer una función que represente una ventaja adaptativa en el caso en que la bacteria se encuentre con una planta que no presente el gen *R* correspondiente (interacciones compatibles). Algunos estudios han demostrado que la pérdida de algunos genes *Avr*, en un ambiente en donde no existan plantas con los genes *R* correspondientes, ocasiona una penalidad o una disminución en la adaptabilidad (*fitness*) al patógeno y una reducción en su patogenicidad. El mecanismo por el cual los genes efectores contribuyen a la patogenicidad comenzó a ser desvelado solamente en los últimos años. Se ha logrado establecer ahora que el papel central de los efectores es suprimir o bloquear las respuestas de defensa que pueden ser activadas por las plantas. Aunque no se ha descrito cuáles son las respuestas de defensa que pueden ser activadas por las plantas, se expondrá muy brevemente la función de los efectores como supresores de dichas respuestas. Para mayor comprensión, se invita al lector a remitirse primero al capítulo X. La función de los efectores como supresores de las respuestas de defensa dentro de un contexto evolutivo general se puede encontrar en el capítulo VII.

La idea de que los patógenos pueden inhibir las respuestas de defensa de las plantas no es novedosa. Algunos años atrás se había establecido que *P. syringae*

pv. *phaseolicola* era capaz de inhibir la expresión de genes de la biosíntesis de fitoalexinas; sin embargo, la evidencia molecular viene de años recientes.

### Inhibición de la PCD

Varios estudios mostraron que AvrPtoB es capaz de inhibir la RH mediada por los genes *Pto* y *Cf-9* cuando estos son coexpresados en plantas de tabaco. La demostración de que AvrPtoB es capaz de inhibir la PCD se logró cuando se introdujo el gen *Bax* (una proteína preapoptótica de la familia Bcl-2 que inicia la PCD en animales) en plantas y se observó que AvrPtoB era capaz de protegerlas de una PCD similar a la RH. Incluso se demostró que el mecanismo anti-PCD podía conservarse entre eucariontes al observar que AvrPtoB era capaz igualmente de inhibir la PCD en levaduras cuando estas se sometían a estreses como peróxido de hidrógeno, menadiona (un agente oxidante) o choque térmico. Actualmente se han identificado cerca de ocho efectores adicionales de *P. s. pv. tomato* capaces de suprimir la RH. Sin embargo, todavía se desconoce cómo logran hacerlo.

### Supresión del remodelamiento de la pared celular

Uno de los mecanismos de defensa que emplean las plantas es reforzar sus paredes celulares a través de estructuras conocidas como papilas y la acumulación de calosa. Empleando análisis de transcriptoma se logró evidenciar que, durante una infección exitosa de *P. syringae* pv. *tomato* en plantas de *Arabidopsis*, varios genes de la planta eran reprimidos, entre los cuales se encuentran genes directamente implicados en la formación de papilas, particularmente extensinas y germinas. Al emplear plantas de *Arabidopsis* que expresan AvrPto de manera condicional, se observó que dichas plantas no acumulaban calosa, y se identificó así a AvrPto como uno de los factores capaces de inhibir la formación de papilas. Otros dos efectores de *Pseudomonas*, HopPtoM y AvrE, han mostrado suprimir igualmente la deposición de calosa en plantas de *Arabidopsis*. Mutantes de *Pseudomonas* en estos genes presentan una pérdida en su virulencia, la cual puede explicarse por su incapacidad de suprimir este remodelamiento de la pared celular. El efector DspA/E de *Erwinia amylovora* también es capaz de suprimir las respuestas de defensa de la pared celular cuando infecta manzanos.

### Activadores de la vía JA

Las vías de señalización que emplean las plantas para activar las respuestas implican la acción del ácido salicílico (AS) del etileno y del ácido jasmónico (JA). Las tres vías están estrechamente interconectadas por diferentes tipos de interacciones positivas y negativas. Sin embargo, se ha considerado por mucho

tiempo que, frente al ataque de patógenos de tipo bacteriano y fúngico, la vía del AS es la que principalmente se activa, mientras que la vía del JA es típicamente inducida en respuesta a herbívoros y heridas. Al activarse la vía del JA, la expresión de genes inducidos por el AS es inhibida, y viceversa. Los patógenos logran modular cada una de estas vías para colonizar sus hospederos. Estudios recientes han mostrado que *Pseudomonas* logra activar la vía del JA para inactivar así la vía del AS. La coronatina (COR) es una fitotoxina producida por *Pseudomonas* que induce la necrosis y presenta cierta similitud estructural con el JA y con el metiljasmonato. Esta semejanza indica que la coronatina podría activar la vía del JA en plantas e inhibir así la del AS. Plantas de *Arabidopsis* y tomate que tienen defectos en la vía del JA son insensibles a la COR y presentan una resistencia incrementada a *P. syringae* pv. *tomato*. El tratamiento de plantas de tomate silvestres con metil-JA es capaz de complementar el defecto de virulencia que presentan cepas de *Pseudomonas* que son defectuosas en la producción de COR. Estos datos sugieren fuertemente que la producción de COR en *Pseudomonas* contribuye significativamente a su patogenicidad al mimetizar la acción del JA endógeno de la planta. Otros efectores de *Pseudomonas* han mostrado que, actuando en conjunto, también activan la vía del JA.

### Sumolación y degradación proteica

Los análisis predictivos de estructura establecieron que YopJ de *Y. pseudotuberculosis* y AvrBsT de *Xcv* son cisteín-proteasas. YopJ es capaz de inhibir la vía MAP kinasas y NF- $\kappa$ B durante las respuestas de defensa de células animales. Estos mismos análisis permitieron establecer que el sitio activo de la cisteín-proteasa es el responsable de esta inhibición y que este mismo centro catalítico en AvrBsT es el responsable de la activación de la RH en plantas resistentes. Además, se encontró que YopJ presenta una similitud estructural con ULP1 de levaduras (Ubiquitin-Like Protease). Este hallazgo sugería que los efectores de bacterias fitopatógenas podían modificar de alguna manera la estabilidad/degradación de proteínas presentes en el hospedero.

SUMO (Small Ubiquitin-Like Modifier) es un pequeño péptido que se adiciona postraduccionalmente a las proteínas por un sistema análogo al sistema de conjugación de ubiquitinas (ver capítulo X.B.10). Varios estudios han mostrado que cierto tipo de efectores de bacterias fitopatógenas (AvrBsT, AvrXv4) y YopJ de *Yersinia pseudotuberculosis* reducen la acumulación de proteínas sumolizadas en las células hospederas. También se ha demostrado que, una vez dentro de las células vegetales, XopD se dirige hacia proteínas del hospedero conjugadas con SUMO para desumolizarlas. Las proteínas desumolizadas sufren entonces procesos de proteólisis, lo que altera la transducción de señales en las células de la planta y beneficia al patógeno. Aún no se conoce cuáles son las proteínas blanco hacia las cuales se dirigen los efectores para desumolizarlas. La localización celular de los efectores podría dar indicios en este sentido. Al respecto se

sabe que algunos efectores se encuentran en el citoplasma y otros en el núcleo, lo que sugiere la amplia diversidad de potenciales proteínas blanco.

Recientemente se ha demostrado que los efectores bacterianos pueden inhibir las respuestas de defensa de las plantas por un mecanismo antagónico a la sumolación, es decir, a través de la degradación de proteínas específicas de la planta (ver capítulo X.B.10). En particular, se logró demostrar que el efector de *P. syringae* HopM1 establece interacciones con la proteína de *Arabidopsis* AtMin7, que es una proteína vegetal asociada con la respuesta inmune. La interacción de HopM1 con AtMin7 produce la desestabilización de esta última a través de la ubiquitinación. La degradación de AtMin7 se lleva a cabo por el complejo del proteasoma de la planta. El resultado final de la degradación de AtMin7 inducida por HopM1 es inhibir el tráfico vesicular, el cual está implicado en la respuesta de defensa de las plantas a nivel de la pared celular.

### Inhibidores de las respuestas de defensa basal

Los patógenos pueden ser reconocidos a través de receptores MAMPs presentes en las células vegetales. Este reconocimiento permite encender las respuestas de defensas basales. Recientemente se ha demostrado que los efectores, en particular cierto tipo de proteínas Avr, ejercen su función a través de la inactivación de las respuestas de defensa basales. Las cascadas MAP kinasas (Mitogen Activated Protein kinases) se activan después de la percepción de los MAMPs en las células vegetales (ver capítulo X.B.6). Se ha demostrado que tanto AvrPto como AvrPtoB son capaces de bloquear la activación de MAPKs mediada por flg22 (un MAMP conocido como flagelina). Estas dos proteínas efectoras inactivaron específicamente la MPK3 y la MPK6 que son activadas por flg22. Sin embargo, otro efector (AvrRpt2) fue incapaz de inactivar estas MAP kinasas; esto demostró la especificidad de AvrPto y AvrPtoB. En células de mamíferos se ha encontrado que YopJ (el efector de *Yersinia*) puede bloquear las vías de señalización MAP kinasas; pero una proteína de la misma familia (AvrBsT) de *Xcv* no es capaz de bloquear la activación de MPK3 y MPK6 mediada por flg22. Este mismo estudio probó que AvrPto y AvrPtoB ejercen su actividad supresora cerca de los receptores MAMPs que se encuentran en la membrana plasmática y antes de la activación de las MAPKKK. Estos resultados muestran que la vía de activación mediada por el reconocimiento de MAMPs previene a las plantas de ser infectadas por muchos microorganismos, pero bacterias virulentas al introducir efectores a través del T3SS pueden lograr inactivar estas vías de señalización permitiendo así a los patógenos colonizar los tejidos vegetales.

La identificación de RIN4 en *Arabidopsis* permitió no solo validar el modelo gen guardián (ver capítulo X), sino que puso en evidencia el rol de dos efectores de *Pseudomonas*, AvrRpt2 y AvrB, en inactivar las defensas basales al modular la actividad de RIN4. La expresión de estos dos efectores en plantas de *Arabidopsis*

permitió que cepas de *Pseudomonas* mutantes en el gen *hrcC* (deficientes en el T3SS) pudieran infectarlas por un mecanismo que implicaba la inactivación de las defensas basales, inhibiendo en particular la deposición de calosa. Además de esto, AvrRpt2 y AvrB inhibieron la activación de la transcripción inducida por flg22 de los genes GST6 (Glutation-S-Transferasa) y *PR-1*. Resultados similares se obtuvieron al expresar la proteína RIN4, sugiriendo que esta proteína es un regulador negativo de las respuestas de defensa basales. Estos datos, sumados al hecho de que tanto AvrRpt2 y AvrB interactúan con RIN4, lo cual sugiere que estos efectores son capaces de suprimir las respuestas de defensa basales a través de la manipulación de proteínas como RIN4 u otras proteínas de la planta.

### C. GENES EFECTORES O AVR EN HONGOS

En hongos podemos definir dos clases de efectores según los sitios en las células vegetales a los cuales sean dirigidos, lo que depende también del estilo de infección y de vida del patógeno. Los efectores llamados apoplásticos son secretados dentro del espacio extracelular donde interactúan con los receptores extracelulares de las células vegetales. Los efectores citoplasmáticos son translocados al interior de las células vegetales muy posiblemente a través de estructuras de infección especializadas, como las vesículas de infección o los haustorios.

Los genes *Avr* más conocidos y caracterizados desde ya hace algunos años corresponden a los producidos por *Cladosporium fulvum* que ataca el tomate. Este hongo no produce estructuras especializadas para captar los nutrientes, y el crecimiento del hongo está confinado al apoplasto. La presentación de las proteínas *Avr* y el reconocimiento de estas por parte de las células vegetales se establecen en el líquido apoplástico. En *C. fulvum* se han identificado las proteínas *Avr9* y *Avr4* que son reconocidas por las proteínas R Cf-9 y Cf-4, respectivamente. El gen *Avr9* codifica una preproteína de 63 aminoácidos y el *Avr4* una preproteína de 145 aminoácidos que, para elicitar las respuestas de defensa, deben ser clivadas en péptidos de 28 y 86 aminoácidos, respectivamente. El procesamiento de los prepéptidos lo llevan a cabo proteasas. En el caso de *Avr9*, una proteasa fúngica genera un péptido de 40 aminoácidos que es secretado y, posteriormente, una proteasa endógena de la planta genera el péptido maduro de 28 aminoácidos. La(s) proteasa(s) implicada(s) en el clivaje de *Avr4* aún no se ha(n) identificado. *Avr9* y *Avr4* presentan un péptido señal que permite su localización extracelular. Mutaciones en los genes *Avr9* y *Avr4* en cepas silvestres hacen que estas sean virulentas. Las proteínas *Avr9* y *Avr4* no presentan similitud entre ellas, ni tampoco con ninguna de las secuencias presentes en las bases de datos. Las características que comparten estos dos genes son: codificar proteínas de bajo peso molecular, ser ricas en cisteínas y ser secretadas durante la infección. El gen *Avr2* de *C. fulvum* codifica una proteína de 78 aminoácidos con ocho residuos de cisteínas y un péptido señal de lo-

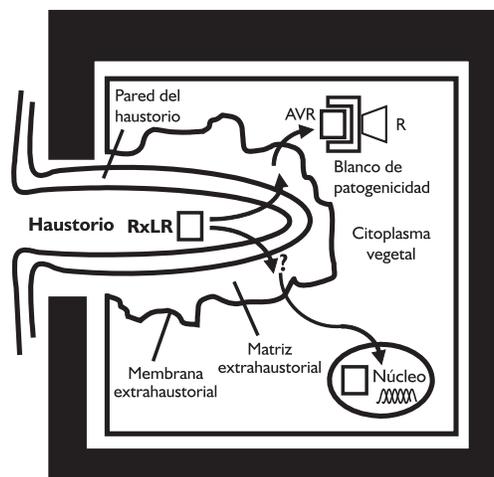
calización extracelular. Lo interesante de esta proteína es que se une e inhibe a la proteína RCR3 de tomate, la cual es una cisteína-proteasa extracelular. Esta interacción molecular es detectada por la proteína R Cf-2, lo que permite que se desencadenen las respuestas de defensa. Otro tipo de proteínas secretadas al apoplasto también han sido identificadas en *C. fulvum*, que podrían actuar como factores de avirulencia en genotipos de tomate aún no identificados.

La identificación de genes efectores en hongos que colonizan los espacios intracelulares ha sido más complicada, precisamente por este estilo de vida. Uno de los genes *Avr* fúngicos que fue recientemente clonado corresponde a *AVR-Pita*, el cual está presente en *Magnaporthe grisea*, un patógeno de arroz. Plantas de arroz que poseen el gen *R* correspondiente (*Pi-ta*) son resistentes a cepas de *M. grisea* que poseen el gen *AVR-Pita*. El gen *AVR-Pita* fue aislado por mapeo posicional y con la ayuda de cepas mutantes se encontró que el gen se ubica en la región telomérica. *AVR-Pita* codifica para una putativa metolo-proteasa dependiente de cinc de 223 aminoácidos. Se cree que esta proteína debe ser procesada para poder interactuar con la proteína *R* correspondiente. Cuando este gen fue introducido en cepas virulentas permitió la activación específica de las respuestas en plantas que contenían el gen *Pi-ta*. Las frecuentes pérdidas espontáneas de *AVR-Pita* parecen ser el resultado de su localización telomérica, lo cual constituye un nuevo mecanismo para generar hipervariabilidad. Otro tipo de mutaciones que también se observaron, tales como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, le pueden permitir al hongo evitar el reconocimiento por parte de la planta y así impedir que se enciendan las respuestas de defensa mediadas por *Pi-ta*.

Otro de los genes *Avr* en hongos recientemente clonados corresponde a *AvrL567* en *Melampsora lini*, el cual infecta plantas de lino. Por mapeo posicional fue posible identificar un locus complejo que determina la avirulencia de *M. lini* sobre plantas de lino que poseen los genes *L5*, *L6* y *L7*. Este estudio permitió identificar dos genes *Avr* candidatos denominados *AvrL567-A* y *AvrL567-B*. La expresión de estos genes induce RH cuando se coexpresan las proteínas *L5*, *L6* y *L7*. Los genes *AvrL567* se expresan en el haustorio y codifican proteínas de 127 aminoácidos que son secretadas.

A diferencia de *M. grisea*, la mayoría de hongos fitopatógenos, por ejemplo los mildes y oomycetos como *Phytophthora*, forman estructuras especializadas llamadas haustorios que penetran la pared celular vegetal pero permanecen separados del citoplasma por una membrana doble. La presencia de haustorios genera una dificultad para que las proteínas efectoras de los patógenos sean introducidas a las células vegetales a fin de reconocerlas. La mayoría de los genes *R* para este tipo de patógenos codifican proteínas que son citoplasmáticas, lo que implica que el reconocimiento ocurre dentro de la célula. Solo hasta hace muy poco fue posible la identificación, clonación y caracterización

de los primeros genes *Avr* en este tipo de patógenos. Cuatro genes *Avr* se identificaron en oomycetes: *Avr1b-1* en *Phytophthora sojae*, *ATR13* y *ATR1<sup>NdWSB</sup>* en *Hyaloperonospora parasitica* que infecta *Arabidopsis* y *AVR3a* en *P. infestans*. En general, estos genes codifican para proteínas relativamente pequeñas (138 aminoácidos para *Avr1b-1* y 321 aminoácidos para *ATR1*) y poseen un péptido señal. Los análisis de alineamiento de estas secuencias permitieron detectar un corto motivo de aminoácidos conservados denominado RxLR, que se encuentra ubicado dentro de los 30 aminoácidos del péptido señal el cual está presente en las proteínas *Avr* de oomycetes y también en otras proteínas secretadas. Este motivo es muy similar al motivo RxLx(E/Q) que se encuentra en las proteínas de virulencia secretadas por *Plasmodium falciparum*, el agente que ocasiona la malaria. Después de la infección, *P. falciparum* se encierra dentro de lo que se conoce como vacuola parasitófora en el interior del citoplasma de los glóbulos rojos, de tal forma que el citoplasma del parásito y el de la célula hospedera quedan separados por dos membranas. Una situación similar se presenta con los haustorios y las células vegetales (figura 21). Los análisis de inmunolocalización en *Plasmodium* han permitido demostrar que este corto motivo es esencial para dirigir las proteínas al citoplasma de los glóbulos rojos, aunque el mecanismo de transporte aún no se conoce y no se sabe si implique una maquinaria molecular producida por el patógeno o por la célula hospedera. Se ha sugerido que el motivo RxLR presente en las proteínas *Avr* de oomycetes está involucrado en dirigir estas proteínas al interior de las células vegetales en un proceso que implica dos pasos: en el primero, se produce la secreción que es dirigida a través de la presencia del péptido señal; posteriormente, en el segundo, se produce la incorporación a la célula vegetal mediada por el motivo RxLR.



**Figura 21.** Modelo de interacción entre oomycetes y hongos con las células vegetales, basado en los últimos resultados obtenidos. El motivo RxLR presente en las proteínas secretadas por los hongos podría constituir la señal para interiorizar las proteínas en el citoplasma vegetal. Ver texto para más detalles.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alfano, J. R., Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol.* 42: 385-414.
- Bonas, U., Lahaye, T. (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol.* 5: 44-50.
- Birch, P. R., Rehmany, A. P., Pritchard, L., Kamoun, S., Beynon, J. L. (2006) Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol.* 14: 8-11.
- Buttner, D., Bonas, U. (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 312-9.
- Cornelis, G. R., Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 54: 735-74.
- Desveaux, D., Singer, A. U., Dangl, J. L. (2006) Type III effector proteins: dopelgangers of bacterial virulence. *Curr Opin Plant Biol.* 9: 376-82.
- Dickinson, M. (2003) Molecular Plant Pathology. Bios Scientific Publishers. London.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Ayliffe, M. A., Ellis, J. G. (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell.* 16: 755-68.
- Fouts, D. E., Abramovitch, R. B., Alfano, J. R., Baldo, A. M., Buell, C. R., Cartinhour, S., Chatterjee, A. K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M. L., Lazarowitz, S. G., Lin, N. C., Martin, G. B., Rehm, A. H., Schneider, D. J., van Dijk, K., Tang, X., Collmer, A. (2002) Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2275-80.
- Greenberg, J. T., Vinatzer, B. A. (2003) Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr Opin Microbiol.* 6: 20-8.
- Gurlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol.* 163: 233-55.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000). Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Gruissem and Jones Eds. Rockville.

- He, S. Y., Nomura, K., Whittam, T. S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochem Biophys Acta* 1694: 181-206.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Sheen, J. (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125: 563-75.
- Lahaye, T., Bonas, U. (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* 6: 479-85.
- Leach, J. E., White, F. F. (1996) Bacterial Avirulence Genes. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 34: 153-79.
- Mudgett, M. B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 56: 509-31.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y. H., Pumplin, N., Jones, J., He, S. H. (2006) A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science* 313: 220-3.
- Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G., Valent, B. (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12: 2019-32.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B., Dixon, J. E. (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290: 1594-7.
- Puhler, A., Arlat, M., Becker, A., Gottfert, M., Morrissey, J. P., O' Gara, F. (2004) What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr Opin Plant Biol.* 7: 137-47.
- Schornack, S., Meyer, A., Romer, P., Jordan, T., Lahaye, T. (2006) Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol.* 163: 256-72.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., Van den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* 26: 523-34.

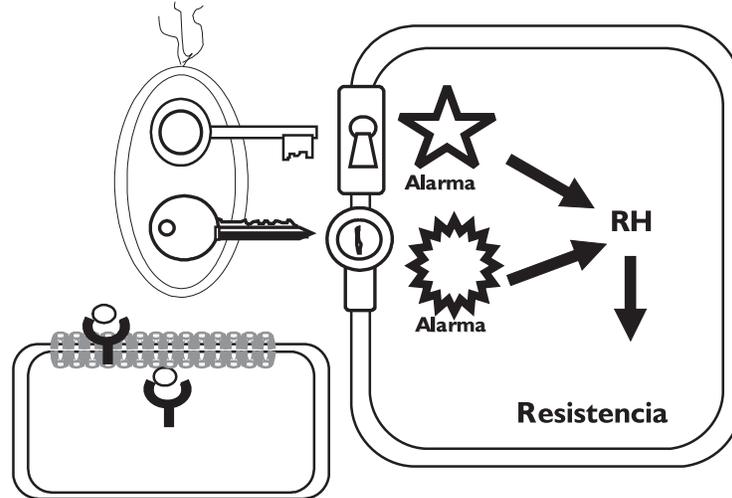
## IX. SEGUNDO ACTO: MODELOS DE INTERACCIÓN

*“¡Mira! Míralos. Son millares y millares, centinelas silenciosos. Terrenos inmóviles, plantados a lo largo de los muelles, de las riberas, a lo largo de las aceras de la plaza Clichy, ahogados por la lluvia, en completa ensoñación oceánica, esperando la bruma, la oleada de las mareas, la llamada ronca de los pájaros del mar”.*

Georges Perec. *Un hombre que duerme.*

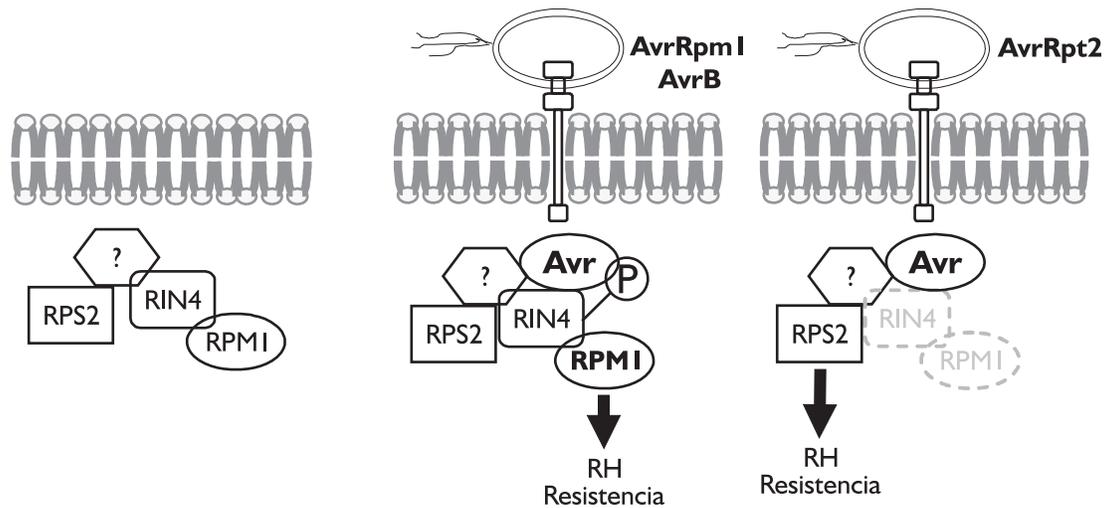
La estructura y la función de los genes que codifican para las proteínas R y Avr se describieron en las secciones precedentes de este libro. A partir de esta información se puede entender la base molecular que subyace al reconocimiento. La interpretación molecular del modelo propuesto por Flor establece que las proteínas R actuarían como receptores de los ligandos de los patógenos que corresponderían a los efectores o proteínas Avr. La presencia del dominio LRR en las proteínas R sirvió como argumento teórico a dicha interpretación, puesto que el dominio LRR está implicado en interacciones proteína-proteína y parece controlar la especificidad a través de la variabilidad en ciertas posiciones de aminoácidos y en el número de unidades repetitivas. Considerando este análisis, se planteó un modelo receptor-ligando o de llave-cerradura en el cual solamente la interacción específica entre un receptor y un ligando permitía activar eficientemente las respuestas de defensa de las plantas (figura 22). Inherente a este modelo estaba la predicción de que cada proteína R podía reconocer única y exclusivamente una proteína Avr. Sin embargo, se demostró posteriormente que algunas proteínas R podían reconocer más de un efector. Así, por ejemplo, las proteínas AvrRpm1 y AvrB son capaces de activar las respuestas mediadas por la misma proteína R, RPM1 de *Arabidopsis*. De manera similar, AvrPtoB y AvrPto son capaces de elicitar las respuestas mediadas por Pto. Curiosamente, ni AvrRpm1 y AvrB, ni tampoco AvrPto y AvrPtoB poseen ningún tipo de similitud en el nivel estructural, ni en el de secuencia.

Por varios años diferentes laboratorios encaminaron importantes esfuerzos para detectar dicha interacción directa entre proteínas R y Avr; sin embargo, los resultados fueron relativamente frustrantes. Actualmente, solo en unos pocos casos se ha podido demostrar una interacción entre dichas proteínas. El caso considerado como fehaciente de la interacción directa lo representaba la interacción entre AvrPto y Pto demostrada mediante el análisis de doble híbrido en levadura. Históricamente se consideró a Pto como la proteína de resistencia que reconocía AvrPto en la interacción tomate-*P. s. pv. tomato*. Sin embargo, Pto requiere de Prf (una proteína de tipo CNL) para poder activar las respuestas de defensa. Ahora se sabe que Pto no es la proteína R, sino Prf. Se ha demostrado una interacción directa entre las proteínas Avr-Pita y Pi-ta en el patosistema arroz-*M. grisea* y RRS1-Pop2 en la interacción *Arabidopsis-R. solanacearum*. En el último caso se demostró que la interacción entre Pop2 y RRS1 era necesaria para dirigir la proteína al núcleo y activar las respuestas de defensa.



**Figura 22.** Modelo llave-cerradura o de receptor-ligando. Las proteínas R actuarían como receptores (cerradura) que reconocerían única y exclusivamente uno de los ligandos o proteínas Avr (llaves) producidas por el patógeno.

El estudio detallado de la función de los genes *R* puso en evidencia la necesidad de la presencia de otras proteínas de la planta para poder reconocer los efectores y activar de manera correcta las respuestas de defensa, tal como ocurre con Pto y Prf. Otros casos similares los constituyen Cf-2 de tomate, que requiere la presencia de RCR3, y PBS1, que se necesita para la activación de respuestas mediadas por RPS5. Estos hechos llevaron a postular en 1998 un modelo en el cual el reconocimiento entre las proteínas *R* y Avr no se establecía de manera directa sino que estaba mediado por una tercera proteína, llamada blanco de patogenicidad. En los casos que mencionamos anteriormente, los blancos de patogenicidad serían Pto, RCR3 y PBS1 que sí interactuarían de manera directa con las proteínas Avr correspondientes. La función de las proteínas *R*, más que reconocer e interactuar con las proteínas Avr, es vigilar, guardar y detectar cambios en las proteínas blanco de patogenicidad. Este modelo fue llamado “gen guardián”. La confirmación experimental de este modelo se obtuvo en el año 2003 con la identificación de RIN4. La proteína RIN4 de *Arabidopsis* se detectó mediante ensayos de doble híbrido empleando AvrB como anzuelo. Posteriormente por estudios de coimmunoprecipitación se demostró que, además de interactuar con AvrB, RIN4 es capaz de interactuar también con las proteínas AvrRpm1 y AvrRpt2 de *P. s. pv. syringae* y con las proteínas RPS2 y RPM1 de *Arabidopsis*. Las proteínas AvrB y AvrRpm1 inducen la resistencia mediada por RPM1, mientras que AvrRpt2 induce la resistencia mediada por RPS2. La presencia de RIN4 es necesaria para activar las respuestas mediadas por RPM1. La actividad específica de AvrB y AvrRpm1 es inducir la fosforilación de RIN4 y esta modificación postraducciona es percibida por RPM1, lo cual permite activar las respuestas de defensa (figura 23).



**Figura 23.** Evidencia experimental del modelo gen guardián gracias a la identificación de la proteína RIN4. En el caso de una bacteria que posea el gen *AvrB* o *AvrRpmI* las proteínas codificadas por estos genes generan la fosforilación de RIN4, la cual es detectada por la proteína RPM1, lo que permite la activación de las respuestas de defensa. En el caso de que la bacteria posea el gen *AvrRpt2*, este efector provoca la desaparición de RIN4 y de RPM1, lo cual permite la activación de las defensas mediadas por RPS2. En este caso RPM1 y RPS2 actúan como guardianes, centinelas que detectan las modificaciones hechas por las proteínas efectores sobre RIN4.

En el caso de interacciones compatibles (plantas de *Arabidopsis* que no poseen el gen *RPM1*), la fosforilación de RIN4 trae como consecuencia la inhibición de las respuestas de defensas basales de la planta. La pérdida de RIN4 bloquea la función de RPM1 y previene su acumulación, lo que sugiere que RIN4 es necesaria para la estabilidad de RPM1. La reducción en los niveles de RIN4 genera plantas que expresan constitutivamente las respuestas de defensa, tal como ocurre en plantas que sobreexpresan ectópicamente proteínas R. Las plantas *rin4* mutantes homocigotas no son viables, ya que expresan constitutivamente las respuestas de defensa debido a la activación ectópica de *RPS2*. Sin embargo, mutaciones en *RPS2* bloquean esta letalidad. Consistente con estas observaciones, posteriormente se encontró que *AvrRpt2*, la otra proteína con la cual interactúa RIN4 y que induce las respuestas mediadas por *RPS2*, es capaz de inducir la desaparición de RIN4. La eliminación de RIN4 es específica de *AvrRpt2* por cuanto otro tipo de efectores no produjeron el mismo resultado. La desaparición de RIN4 no ocurre a nivel del ARNm sino a nivel proteico. La desaparición de RIN4 es necesaria para que se activen las respuestas mediadas por *RPS2* (figura 23). La proteína *AvrRpt2* es una cisteín-proteasa, la cual es clivada en dos péptidos al ser inyectada al interior de la célula vegetal a través del T3SS. El clivaje de *AvrRpt2* se requiere para activar las respuestas de defensa mediadas por *RPS2*. Recientemente se demostró que la proteína vegetal

responsable del clivaje de AvrRpt2 es una ciclofilina. En el caso de plantas que presenten el gen *RPM1* pero que no presenten el gen *RPS2*, AvrRpt2 al degradar RIN4 actuaría como un supresor de las respuestas de defensa. Al degradar RIN4, RPM1 no podría detectar su fosforilación y, en consecuencia, las respuestas mediadas por *RPM1* no se activarían.

El papel de las proteínas R en este contexto es percibir los cambios (fosforilación o desaparición) de una proteína blanco de patogenicidad (RIN4). Las proteínas R están guardando, vigilando el estado de estas proteínas blanco, y cuando perciben estas modificaciones se “enteran” de que un organismo intruso ha hecho aparición y despliegan entonces las respuestas de defensa. Estas interacciones, según lo muestran datos experimentales, se dan en el lado citoplásmico de las membranas celulares. El conocimiento disponible sobre el mecanismo de resistencia, mediado por *RPS5* y *Cf-2*, apoya el modelo gen guardián.

En *Arabidopsis*, el reconocimiento de AvrPphB de *P. syringae* requiere tanto de RPS5, una proteína de tipo CNL, como de PBS1, una STK. La introducción de AvrPphB en las células vegetales vía el T3SS produce la ruptura de PBS1, el cual es un prerrequisito para la activación de las respuestas mediadas por *RPS5*. De esta forma, la proteína R, RPS5 detecta el clivaje de una proteína blanco de patogenicidad (PBS1) para encender las respuestas de defensa. De manera similar a AvrRpt2, el clivaje de PBS1 requiere primero que AvrPphB sea clivado, lo cual es llevado a cabo por la misma proteína. De hecho, AvrPphB es una proteína de tipo cisteín-proteasa.

En el patosistema tomate-*C. fulvum*, la resistencia mediada por *Cf-2* requiere específicamente de RCR3. Otros miembros de la familia *Cf* (*Cf-9* o *Cf-5*), a pesar de presentar un alto nivel de similitud con *Cf-2*, no requieren de RCR3. RCR3 codifica una cisteín-proteasa extracelular. Aunque aún no se ha demostrado, se ha sugerido que RCR3 actúa como el verdadero receptor de Avr2. La interacción Avr2-RCR3 provocaría algún cambio en la proteína RCR3 (posiblemente un cambio conformacional o la disrupción de un complejo con otras proteínas), el cual sería percibido por *Cf-2*, lo que permitirá la activación de las respuestas de defensa.

Recientemente se ha descrito una interacción directa entre otras proteínas R y Avr, dando apoyo al modelo receptor-ligando y que merece una descripción detallada. Curiosamente, esto se logró establecer en el patosistema Lino-*M. lini*, que fue el modelo sobre el cual Flor propuso el modelo gen por gen. La resistencia de lino a *M. lini* está mediada por el locus *L*, que es polimórfico con al menos 13 alelos diferentes conocidos y, como se mencionó anteriormente, el dominio LRR de este gen se ha encontrado sometido bajo selección diversificadora. El gen *Avr* correspondiente, *AvrL567*, recientemente clonado y caracterizado, permite la activación de la resistencia mediada específicamente por los alelos *L5*, *L6* y *L7*. Los análisis de doble híbrido demostraron la

interacción directa y específica entre las proteínas L y AvrL567. La importancia de este trabajo no radica en la demostración de la interacción directa entre estas proteínas (ya otros estudios lo habían reportado), sino en su análisis a la luz de las fuerzas selectivas que favorecen un tipo de interacción directa o una indirecta. Se pudo demostrar que el locus *AvrL567* es altamente polimórfico, producto de la acción de la selección diversificadora. La principal fuerza evolutiva que está dirigiendo la evolución de los genes *AvrL567* es su capacidad de escapar del reconocimiento y, por lo tanto, de la resistencia del hospedero. En el caso de reconocimiento directo, las mutaciones en los genes *Avr* que le permiten al patógeno evadir las respuestas de defensa de la planta no deben, casi imperativamente, provocarle una penalidad en su capacidad patogénica. En el caso particular de *AvrL567*, se observó que podían existir mutaciones en ciertos aminoácidos, pero la estructura de las diferentes variantes se mantenía, lo que sugiere una conservación inclusive de la función.

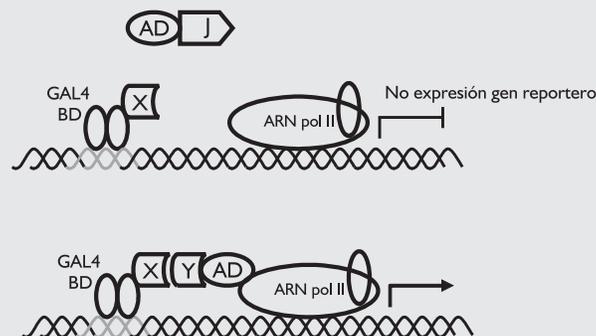
A diferencia de lo que ocurre con el locus *L*, los genes *R* que actúan como “guardianes” (reconocimiento indirecto) presentan una diversidad alélica muy baja; los alelos funcionales son ancestrales y se mantienen por selección balanceadora. Del lado de los patógenos en los que se ha observado una interacción indirecta con las proteínas *R*, la diversidad en los genes *Avr* correspondientes está determinada básicamente por la presencia/ausencia en diferentes cepas. En el caso de una interacción indirecta, el patógeno puede darse el “lujo” de perder su gen *Avr* y “emplear” uno nuevo (posiblemente adquirido gracias a la transferencia génica horizontal) para cumplir la función perdida por este efector sin que se vea comprometida su capacidad patogénica.

En resumen, el reconocimiento directo debe estar asociado con una alta diversidad genética en los loci de los genes *R* y *Avr*, mientras que para el caso del reconocimiento indirecto la evolución ha mantenido polimorfismos balanceados en estos genes. Muy posiblemente, las historias evolutivas de cada patosistema están influyendo en la adopción de un sistema de reconocimiento u otro. El parasitismo obligado y el estrecho rango de hospederos han permitido, muy probablemente, la estrecha coevolución de genes *R-Avr* (como es el caso de lino y *M. lini*). En los patosistemas donde el patógeno puede infectar un amplio rango de hospederos y puede sobrevivir fuera de la planta (por ejemplo, *Pseudomonas*) se presenta una coevolución más “laxa” entre proteínas *Avr* y *R*. Diferencias en la función de los efectores pueden también definir qué sistema de reconocimiento adoptar. En el caso de las interacciones indirectas, los efectores producen cambios en proteínas de la planta, como la degradación y/o fosforilación, que son fácilmente monitoreados y detectados por los genes guardianes o genes *R*. Mientras que en otros casos los efectores pueden producir cambios sutiles en las proteínas del hospedero que no serían percibidos por proteínas “guardianes”; y, de esta forma, el único medio de percepción sería el reconocimiento mismo de la proteína efectora.

Actualmente no se puede establecer que un modelo de reconocimiento sea más válido que otro. La identificación de los mecanismos de reconocimiento en otros patosistemas, junto con el estudio de diversidad alélica y de polimorfismos en los genes *R* y *Avr*, permitirán establecer de manera más clara cuáles son las fuerzas coevolutivas que han moldeado la adopción de los diferentes mecanismos de reconocimiento.

### BOX 5 DOBLE HÍBRIDO

El diálogo molecular que se establece entre plantas y patógenos implica la interacción no solamente entre proteínas producidas por la planta y el patógeno, sino igualmente entre diferentes proteínas vegetales dentro de la célula así como también entre proteínas dentro de las células de los patógenos. El sistema de doble híbrido en levaduras permite identificar interacciones entre proteínas. El doble híbrido se basa en la naturaleza modular de los factores transcripcionales eucariotes. Los factores de transcripción poseen un dominio de unión al ADN (Binding Domain, BD) y un dominio de activación (Activation Domain, AD). A través del BD, la proteína se une específicamente a secuencias de ADN presentes en el promotor de los genes. El dominio de activación permite la interacción del factor transcripcional con otras proteínas de la maquinaria transcripcional, lo que facilita iniciar la transcripción de un gen particular. Los genes de los dominios BD y AD pueden separarse y expresarse como proteínas separadas en vectores individuales. Para establecer si dos proteínas (por ejemplo, X y Y) interactúan, los genes que codifican para cada una de ellas son clonados en fusión con el vector que contiene el BD y con el AD, respectivamente. Al introducir de manera simultánea los dos vectores en levadura, solo en el caso de que las proteínas X y Y interactúen, se podrá restaurar un factor de transcripción activo, lo cual permitirá la expresión de un gen reportero particular. Si las proteínas X y Y no interactúan, no se puede activar la transcripción del gen reportero. Los genes reporteros deben permitir identificar fácilmente un fenotipo. En la mayoría de los casos se emplean genes reporteros como aquellos que confieren autotrofia a ciertos nutrientes o la expresión de genes como *lacZ* que permiten la detección de una coloración azul producto de la degradación de un sustrato. Este método ha sido ampliamente empleado para identificar nuevas proteínas de unión, mapear los dominios implicados en las interacciones proteína-proteína y estudiar el efecto de mutaciones en las interacciones proteicas.



## BIBLIOGRAFÍA

- Axtell, M. J., Staskawicz, B. J. (2003) Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112: 369-77.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8024-9.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., Kobe, B., Ellis, J. G. (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8888-93.
- Flor, H. H. (1955) Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19: 4004-14.
- Kim, Y. J., Lin, N. C., Martin, G. B. (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* 109: 589-98.
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., Dangl, J. L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 743-54.
- Mackey, D., Belkadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Dangl, J. L. (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112: 379-89.
- van der Biezen, E. A., Jones, J. D. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for gene concept. *Trends Biochem Sci* 23: 454-6.

## X. TERCER ACTO: LA RESPUESTA DE DEFENSA

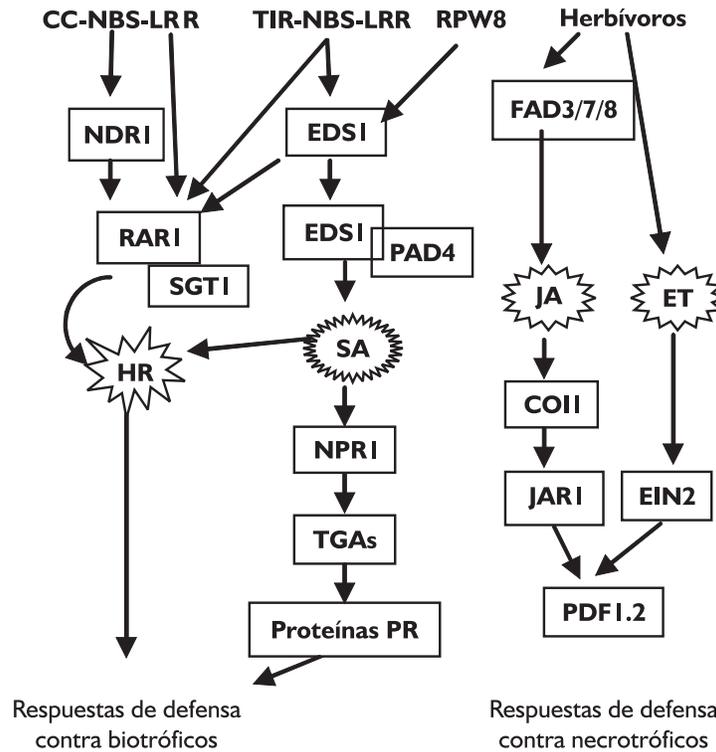
*“A dónde llegaré por esta vía, aún no lo sé: me gusta descubrir mi camino mientras lo recorro y en cada recodo espero una sorpresa, un paisaje diferente, y también una nueva dificultad, un nuevo obstáculo por superar”.*

Italo Calvino.

### A. GENES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN

La activación de la vía de transducción de señales que permite la activación de las respuestas de defensa requiere la presencia de otros genes, además de los genes *R*. Estos genes adicionales actúan posteriormente al reconocimiento mediado por las proteínas *R*. La búsqueda de mutantes que han perdido la capacidad de responder a las respuestas mediadas por proteínas *R* ha permitido la identificación de varios genes. La identificación y análisis de estos genes han permitido definir, al menos parcialmente, tres vías independientes. Estas vías permiten el remodelamiento transcripcional que está asociado con la activación de las respuestas de defensa. Dos de estas vías están definidas por el requerimiento de *EDS1* (*enhanced disease susceptibility*) y *PAD4* (*phytoalexin deficient*) o por *NDR1* (*non-race specific disease resistance*) (figura 24).

Los genes *EDS1* y *PAD4* son requeridos por un amplio grupo de genes *R* de la clase TNL y se ha logrado demostrar además que *EDS1* interactúa físicamente con *PAD4*. *EDS1* y *PAD4* codifican posibles proteínas lipasas, aunque no se ha demostrado una actividad enzimática para ninguna de estas dos proteínas. Tanto *EDS1* como *PAD4* son necesarias para la acumulación de AS y para la potenciación de las respuestas de defensa que implican la producción de ROS. El AS por sí mismo contribuye a la expresión de *EDS1* y *PAD4* formando un bucle de retroalimentación que es importante para la amplificación de las respuestas de defensa. Recientemente se ha demostrado un rol de *EDS1* y *PAD4* en traducir señales redox como respuestas a factores bióticos y abióticos. Estas proteínas parecen tener un efecto antagónico sobre las vías mediadas por el JA y por el etileno. La identificación de SAG101 (Senescence Associated Gene 101), como una nueva proteína adicional que interactúa con *EDS1*, sugiere que *EDS1* puede formar diferentes complejos proteicos. Resulta un tanto contradictorio el hecho de que *EDS1* y *PAD4* estén presentes en todas las especies vegetales incluyendo monocotiledóneas, en el sentido de que estas plantas no presentan genes de la clase TNL. Esto sugiere que deben existir mecanismos desconocidos mediante los cuales estos genes contribuyen a la activación de la resistencia mediada por otro tipo de genes. La otra vía requiere el gen *NDR1*, el cual codifica una probable glicosilfosfatidilinositol (GPI) que parece estar anclada a la membrana de la célula vegetal, aunque no se tiene información acerca de su actividad bioquímica (figura 24).



**Figura 24.** La vía de señalización durante las respuestas de defensa. Se observa la vía mediada por el gen *NDR1* (genes de tipo CNL), la vía que depende de los genes *EDS1* y *PAD4* (genes de tipo TNL) y una tercera vía en la cual los genes *R* no poseen una estructura definida pero dependen de *EDS1*. Estas tres vías están asociadas con la acumulación de AS. También se representan las vías mediadas por JA y ET.

El empleo de mutantes en *eds1* y *ndr1* y la observación de la pérdida de la función mediada por genes *R* específicos sugirió inicialmente un modelo de “dos vías”. Este modelo establecía que los genes *R* de tipo CNL funcionaban a través de la señalización empleando *NDR1*, mientras que los genes *R* de tipo TNL empleaban la señalización mediada por *EDS1*. Sin embargo, posteriormente se demostró que existían casos que no cumplían con esta generalización. Por ejemplo, los genes *RPP8* y *RPP13* que confieren resistencia en *Arabidopsis* contra *P. parasitica* son de la clase CNL y funcionan aun en ausencia de *EDS1* o *NDR1*, lo que sugiere que algunas proteínas de tipo CNL podrían emplear una tercera vía de señalización en la cual ninguno de estos genes está implicado (figura 24). Un caso aún más sorprendente lo constituyen los genes *RPW8.1* y *RPW8.2* que confieren resistencia en *Arabidopsis* contra un amplio espectro de mildes. Estos genes codifican proteínas que solo presentan una estructura Coiled-Coil y no poseen dominios NBS ni LRR, pero requieren de *EDS1* para su funcionamiento (figura 24).

## B. ACTIVACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS

*“Porque cada uno de vosotros tenéis vuestra propia muerte, la transportáis en algún lugar secreto desde que nacéis, ella te pertenece, tú le perteneces, Y los animales, y los vegetales, Supongo que a ellos les pasará lo mismo, Cada cual con su muerte, Así es, entonces las muertes son muchas, tantas como seres vivos existieron, existen y existirán”.*

José Saramago. *Las intermitencias de la muerte.*

### I. LA RH

La principal manifestación macroscópica que se observa una vez que ha ocurrido el reconocimiento del patógeno por la planta (en términos moleculares, la interacción directa o indirecta entre proteínas R y Avr) es la RH. Esta RH es un tipo de muerte celular programada (PCD). En animales el fenómeno de apoptosis, estudiado en detalle, es un tipo de PCD. La apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, la ruptura del ADN en fragmentos de 180 pb y la formación de cuerpos apoptóticos los cuales son captados y degradados por células vecinas. En plantas no se ha observado el fenómeno de apoptosis y dada la presencia de la pared celular resulta complicada la absorción de los cuerpos apoptóticos. La necrosis es otro tipo de PCD que ocurre cuando las células sufren algún tipo de daño físico.

Varias líneas de evidencia sugieren que la PCD durante la RH es genéticamente programada por la célula vegetal y no es el resultado de la muerte directa provocada por el patógeno. El estudio de la RH se ha beneficiado con la identificación de mutantes que presentan un colapso tisular espontáneo en ciertas áreas localizadas, similar al que se observa durante la RH. En estos mutantes, denominados *lesion-mimic*, la RH se forma aun en ausencia del patógeno. Las plantas que presentan este fenotipo han sido denominadas “paranoicas”, ya que se comportan como si estuvieran siendo constantemente atacadas por patógenos.

La RH se observa como lesiones necróticas en interacciones incompatibles cuando se introduce un inóculo que es capaz de inducir una respuesta en más del 50% de las células. En cierto sentido se puede considerar que la RH es un artefacto de laboratorio ya que se emplean grandes cantidades de inóculo para observar un fenotipo macroscópico visible al ojo humano. La visualización de la RH puede estar condicionada por parámetros ambientales particulares y puede ser atenuada a altas humedades. El empleo de inóculos menores produce una PCD en células individuales sin causar un colapso tisular visible.

Por mucho tiempo y aún varios investigadores consideran que la manifestación de la RH es un criterio para definir una resistencia de tipo cualitativo

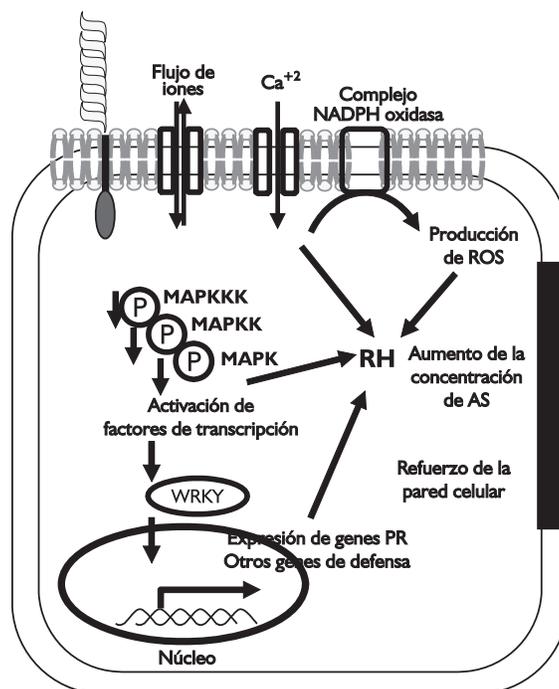
mediada por genes *R* y *Avr*. Sin embargo, la presencia o ausencia de una RH no prueba que exista o no un mecanismo de resistencia cualitativo. La PCD es muy rápida y ocurre en las primeras 6 horas de la infección, aunque esta cinética puede variar según el patosistema bajo estudio. Usualmente la PCD comienza con una serie de aberraciones de la membrana, como la peroxidación, el eflujo de  $K^+$  y el influjo de  $Ca^{+2}$ , lo cual produce la despolarización de la membrana. La RH está acompañada también de un estallido oxidativo en el cual están implicados los ROS (ver capítulo X.B.3). Posteriormente ocurren cambios en la morfología de la célula, como la vacuolarización del citoplasma, y en algunos casos la degradación del ADN y del ARN por nucleasas, lo que ha sugerido que en ciertos casos la PCD durante la RH puede seguir una ruta “apoptótica” como se ha descrito en animales. El papel de la RH y de la PCD es confinar al patógeno en el sitio de la infección para evitar su crecimiento, multiplicación y diseminación. Esto puede ser cierto para patógenos biotróficos obligados y virus que requieren que las células del hospedero estén vivas para poder captar sus nutrientes y multiplicarse. Sin embargo, para los patógenos hemibiotróficos y necrotrofos el rol de la RH es menos claro, ya que estos patógenos obtienen sus nutrientes de las células muertas. Se ha sugerido que al producirse la PCD se liberan compuestos altamente tóxicos para los patógenos que normalmente están presentes en las vacuolas, los cuales son liberados al romperse las vacuolas.

Los mecanismos que controlan que la PCD no se extienda a un número ilimitado de células durante las RH han sido relativamente poco estudiados. Las células vegetales que sufren PCD no pueden ser eliminadas por fagocitosis; por consiguiente, las células sanas deben protegerse de los compuestos tóxicos generados por las células muertas. En los últimos dos años se ha acumulado evidencia que indica que la autofagia es inducida durante las respuestas inmunes de las plantas y que este puede ser el mecanismo por el cual la PCD no se extiende a células vecinas. La autofagia es un proceso en el cual los constituyentes citoplasmáticos, incorporados en vesículas de doble membrana (los autofagosomas), son dirigidos hacia la vacuola o los lisosomas para ser degradados. Recientemente se ha logrado identificar y caracterizar la función de genes *ATG* (AuTophagy) en plantas. Los genes *ATG* han sido previamente identificados en levaduras como componentes importantes para la correcta actividad autofágica. En *Arabidopsis*, los genes *AtATG4a/b*, *AtATG8* y *AtATG6/Beclin1* implicados en la actividad autofágica son capaces de complementar cepas de levaduras con los correspondientes genes endógenos mutados, restableciendo su capacidad de formar autofagosomas y desarrollar actividad autofágica. Plantas de *Arabidopsis* mutantes en algunos de estos genes presentan una senescencia acelerada. En tabaco la inactivación del gen ortólogo *ATG6/Beclin 1* produjo una RH descontrolada después de la infección con TMV, pero solamente en plantas que poseen el gen de resistencia *N*. En estas plantas la autofagia se vio reducida en el sitio donde se produjo la RH y en las células aledañas. Además

de *Beclin 1*, se logró identificar otros genes de autofagia, como *ATG3* y *ATG4* que son necesarios para limitar la PCD en el sitio de infección. Estos datos proporcionan una fuerte evidencia de que la autofagia es un factor fundamental en controlar la PCD en células sanas que todavía no han sido infectadas.

## 2. FLUJOS IÓNICOS

Frente al ataque por patógenos, una de las primeras respuestas que se observa en las células vegetales es el flujo de iones a través de las membranas plasmáticas, el cual consiste básicamente en la salida de iones  $K^+$  y la entrada de  $Ca^{2+}$ . Estos eventos ocurren antes de la producción de ROS. Se ha demostrado que la ausencia de calcio en el medio de cultivo de células tratadas con elicitores inhibe las respuestas de defensa; esto indica que el calcio es de gran importancia durante la defensa (figura 25).



**Figura 25.** Representación esquemática de la activación de diferentes tipos de respuestas de defensa. Se observa el flujo de iones, la producción de ROS, la activación de cascadas MAP kinasas, la inducción de genes PR y el refuerzo de la pared celular. Estos eventos conducen parcialmente a la RH.

## 3. PRODUCCIÓN DE ROS

Las especies de oxígeno reactivas (ROS) desempeñan un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas. Los ROS se producen en interac-

ciones tanto compatibles como incompatibles, pero en estas últimas se origina una inducción más prolongada y más fuerte. Los ROS son el producto de una serie de reacciones secuenciales del oxígeno molecular, principalmente del radical superóxido ( $O_2^-$ ), del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del radical hidróxilo (OH) (figura 25). Los ROS son producidos de manera normal por las plantas y son removidos a través de enzimas como la glutatión, superóxido dismutasa y catalasas para evitar que causen un daño prolongado a las células. Sin embargo, durante el ataque por los patógenos, la producción de ROS es tan elevada que superan la tasa de remoción llevada a cabo por estas enzimas. El radical superóxido en plantas puede ser generado básicamente a través de dos vías: mediante NADPH/NADH oxidasas o por peroxidasas apoplásticas. La producción de superóxido mediado por NADPH oxidasas es análoga al sistema empleado por los neutrófilos en mamíferos. La identificación de un gen similar a la NADPH-oxidasa gp91<sup>phox</sup> de mamíferos en varias especies de plantas proporcionó la evidencia de la existencia de esta vía. La presencia de dominios de unión al calcio en el extremo N-terminal de estos genes sugiere que su actividad puede estar mediada por iones calcio. Las peroxidasas apoplásticas son capaces de generar ROS aun a pH alcalinos, los cuales se generan a través del flujo de iones que caracterizan las respuestas de las células frente a la invasión por patógenos. La producción de plantas transgénicas que producen bajos niveles en la expresión de peroxidasas y que presentan una susceptibilidad mayor a patógenos sustenta un rol de estas peroxidasas en la producción de ROS. Tanto el  $O_2^-$  como el  $H_2O_2$  son moderadamente reactivos, pero cuando ocurre el daño celular se produce la protonación del  $O_2^-$  generando  $HO_2$  el cual puede atacar ácidos grasos directamente y convertir el ácido linoleico, el ácido linoleico y el ácido arachidónico en peróxidos-lipídicos, los cuales provocan el daño de las membranas celulares y se constituyen en moléculas señal.

Los ROS pueden tener varias funciones durante las respuestas de defensa. El  $H_2O_2$  puede ser directamente tóxico para los patógenos y puede también contribuir a reforzar las paredes celulares, ya que el  $H_2O_2$  es esencial para la formación de precursores de polímeros de lignina vía actividad peroxidasa. El refuerzo de las paredes celulares constituye una barrera adicional para el patógeno, que dificulta su colonización a nuevas células vegetales. Los ROS también pueden tener un rol en la señalización. El  $H_2O_2$  incrementa la actividad de la enzima BA2-H (ácido benzoico-2-hidrolasa), la cual es necesaria para la biosíntesis de AS, y permite también la activación de otros genes de defensa como la PAL y la Glutathion-S-transferasa.

#### 4. PRODUCCIÓN DE AS

En reacciones incompatibles se observa una acumulación de AS libre, el cual se ha asociado con la RH. La síntesis del AS ocurre a través de la vía bioquímica del fenilpropanoide, pero también se ha determinado recientemente una vía

alternativa a partir del corismato por la vía isocorismato, la cual es la principal fuente de AS durante la respuesta SAR (ver capítulo XII).

El AS puede tener un efecto tóxico directo sobre los patógenos. El incremento en AS permite la activación de genes de defensa y de otros genes implicados en la vía de señalización. Los niveles altos de AS parecen bloquear la activación de otras vías (como la del etileno y JA), inactivando la expresión de genes antagonistas. La importancia del AS en la activación de las respuestas de defensa se ha evidenciado por la utilización de compuestos químicos análogos al AS, como el INA, los cuales también tienen un efecto similar. El estudio de la importancia que tiene el AS en las respuestas de defensa vegetales se ha basado principalmente en el empleo de plantas transgénicas que contienen el gen *nahG*, el cual codifica una salicilato hidrolasa que convierte el AS en catecol y hace que estas plantas transgénicas sean deficientes en la capacidad de acumular AS. Empleando este tipo de plantas transgénicas se ha logrado demostrar que el AS es un componente importante en la activación de las respuestas de defensa mediadas por varias proteínas R. Sin embargo, recientemente se ha identificado que estas plantas transgénicas presentan efectos pleiotrópicos, por lo cual los fenotipos observados no pueden atribuirse directamente a la ausencia de AS. Otras funciones del AS se presentan en los capítulos IX y X.

## 5. PRODUCCIÓN DE ON

En los últimos años se ha logrado determinar que el óxido nítrico (ON) es un elemento que hace parte de las respuestas de defensa de las plantas. El ON es producido por las plantas bajo condiciones de estrés, pero también bajo condiciones de crecimiento normales. El ON está implicado en la regulación del desarrollo, en promover la germinación, en el crecimiento de hojas y raíces y también retarda la senescencia de hojas y la maduración de frutos. Su rol como parte de las respuestas de defensa apenas está cobrando interés gracias a la evidencia acumulada en los últimos años. La función del ON en células de mamíferos es conocida desde hace ya varios años, en donde juega un papel importante como segundo mensajero que permite el control de diversos procesos, entre los cuales se encuentra la respuesta inmune. La acumulación de ON se ha observado en plantas instantes después de la infección. La presencia tanto del ON como de los ROS es necesaria para inducir la RH. El ON se requiere también para inducir ciertos genes de defensa como *PAL* y *PR-1*. En animales, el ON es generado principalmente por una óxido nítrico sintasa (ONS). En plantas, recientemente se reportó el aislamiento de enzimas tipo ONS, las cuales eran inducidas por patógenos (iONS). En plantas de tomate, se ha establecido que iONS es primordial para el mantenimiento de las respuestas de defensa basales contra el ataque de *Pseudomonas*. Otra enzima de tipo ONS, recientemente clonada, es activada por hormonas pero no muestra similitud ni con las iONS de plantas ni con la ONS de mamíferos.

Varias líneas de evidencia sugieren la existencia de un bucle de retroalimentación y una interconexión en la producción de ON, ROS y AS que es importante para el control de la activación del programa de defensa. Estas tres moléculas parecen actuar sinérgicamente para encender la RH.

## 6. MAP KINASAS (MAPK)

Las MAP (Mitogen Activated Protein) kinasas son un componente fundamental durante la vía de señalización que permite desencadenar las respuestas de defensa. La vía de señalización mediada por MAP kinasas es un mecanismo común en eucariontes para traducir señales externas percibidas por los receptores de la superficie celular y activar respuestas celulares internas. Esta vía implica la activación en cascada de MAP kinasas a través de la fosforilación en los residuos serina/treonina. La cascada involucra tres proteínas kinasas funcionalmente relacionadas: una MAPK kinasa kinasa (MAPKKK), una MAPK kinasa (MAPKK) y una MAPK (figura 25). En respuesta a un estímulo una MAPKKK se fosforila lo cual permite activar una MAPKK, la cual a su vez fosforila una MAPK que se torna activa. Una vez se ha activado, esta MAPK terminal puede fosforilar proteínas blanco lo que permite encender las respuestas celulares. Varias MAPK han sido implicadas en las respuestas de defensa a varios patógenos. La actividad de MAPK ha sido detectada en respuesta al reconocimiento de proteínas tanto Avr como de MAMPs; esto sugiere un punto de convergencia entre las respuestas basales y las inducidas por genes *R*. La disección de la cascada de señalización activada por *flg22* que tiene lugar en *Arabidopsis* permitió la identificación de AtMEKK1, AtMCK4a/5a y AtMPK3/6 como MAPKKK, MAPKK y MAPK, respectivamente. La fosforilación de AtMPK3/6 permite la activación de factores de transcripción de tipo WRKY que inducen la expresión de genes de defensa como *PAL*, *PR-1* y *PR-5*.

La primera MAP kinasa implicada en la señalización durante la defensa identificada fue una MAPK en tabaco inducida por AS, por lo cual se llamó NtSIPK (Salicylic Induced Protein Kinase). Otra MAP kinasa inducida en tabaco como respuesta a heridas fue llamada NtWIPK (Wound Induced Protein Kinase). Estas kinasas comparten la misma MAPKK: NtMEK2. Posteriormente se demostró que NtSIPK y NtWIPK también son inducidas en tabaco después de la infección con TMV y en presencia de Avr9, lo cual sugiere que estas MAP kinasas son puntos de convergencia en la respuesta a diferentes estímulos. Otras MAPK han sido aisladas recientemente en tomate. LeMPK1 y LeMPK2 muestran un alto grado de similitud con NtSIPK/AtMPK6, y LeMPK3 es muy similar a NtWIPK/AtMPK3. Así como NtWIPK, LeMPK3 es regulada a nivel transcripcional. LeMPK1 y LeMPK2 son activadas a través de la acción de diferentes elicitores. Estudios hechos en tomate durante la interacción AvrPto-Pto permitieron identificar dos vías separadas pero interdependientes de cascadas MAPK. La primera involucra LeMCK2 (que es similar a NtMEK2 y AtMCK4/5) y LeMPK3. La otra vía está compuesta

por LeMKK3 (originalmente llamada LeMEK1 y que es similar a NtMEK1) y una MAPK similar a Ntf6. De esta forma, parece ser que tanto tomate como tabaco utilizan dos cascadas MAPK para activar las defensas.

Con la secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis* se ha podido establecer el número de MAP kinasas en esta especie. En *Arabidopsis* existen 60 genes que codifican putativas MAPKKs, 10 que codifican MAPKKs y 20 MAPKs. Sin embargo, de estas 20 MAPK, solamente dos han sido implicadas en respuestas de defensa: AtMPK3 y AtMPK6.

La función de las MAPK no es solo actuar como reguladores positivos de las vías de señalización que ocurren en respuesta a patógenos. A diferencia de AtMEKK1, AtMKK4a/5a y AtMPK3/6, que actúan como reguladores positivos, EDR1 (una MAPKKK) y MAPK4 (una MAPK) están implicadas en una regulación negativa. Plantas de *Arabidopsis*, en las cuales los genes *edr1* y *mpk4* son mutados, presentan un mayor nivel de resistencia a patógenos virulentos y expresan de manera constitutiva varios genes *PR*.

## 7. REFUERZO DE LA PARED CELULAR

Los precursores fenólicos para la síntesis de lignina presentes en la pared celular y los radicales libres producidos durante las reacciones de polimerización de los compuestos de la pared celular, se constituyen en barreras estructurales y compuestos tóxicos que pueden afectar la colonización de las células vegetales por parte de los patógenos (figura 25).

Una de las respuestas que implican la fortificación de la pared celular ante el ataque de patógenos es la formación de papilas. La composición química de las papilas es bastante heterogénea. La función de las papilas es bloquear la penetración y dispersión de los patógenos. La rápida deposición de calosa (un polímero formado por  $\beta$ -1-3 glucano) en las paredes de las células vegetales se asocia también con las respuestas frente a la infección de patógenos en el caso de interacciones incompatibles. La enzima calosa sintasa se expresa constitutivamente en las membranas celulares y cataliza la formación de polímeros  $\beta$ -1-3 glucanos. El bloqueo de los plasmodesmos con calosa es un componente importante en las respuestas de defensa virales ya que impiden su movimiento de célula a célula. Glicoproteínas básicas ricas en hidroxiprolina (HRGP), tales como extensinas, compuestos fenólicos como lignina y suberina juegan también un rol importante en la reorganización de la arquitectura de la pared celular.

La lignificación de las paredes es una estrategia que permite evitar la colonización de nuevas células por parte del patógeno. Al inhibir enzimas implicadas en la biosíntesis de lignina como la cinamyl alcohol deshidrogenasa (CAD) en trigo, se observó una disminución en la lignificación de las paredes celulares, lo

que permitió el incremento de la multiplicación del hongo y se llegó a observar incluso su esporulación.

## 8. FITOALEXINAS

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular y lipofílicos que se acumulan rápidamente alrededor del sitio de la infección. Las fitoalexinas son productos del metabolismo secundario de las plantas, es decir que no son esenciales para sus procesos metabólicos fundamentales. La naturaleza química de este tipo de compuestos es muy variada e incluye derivados de terpenoides (como los sesquiterpenos), saponinas, derivados ácidos alifáticos, fenoles y fenilpropanoides (como los isoflavonoides) y compuestos orgánicos nitrogenados (alcaloides). Muchos de estos compuestos son derivados de las vías de isoprenoides, fenilpropanoide, de alcaloides o de ácidos grasos. Algunos genes que codifican ciertas enzimas involucradas en estas vías, como la *PAL* o la *chalcona sintasa*, han mostrado ser inducidos en respuesta a la infección por patógenos y están asociados con la RH. Especies vegetales dentro de la misma familia tienden a emplear el mismo conjunto de compuestos químicos como productos antimicrobianos. Por ejemplo, los sesquiterpenos son importantes para todas las especies de la familia *Solanaceae*. Varios genes implicados en la producción de la fitoalexina camalexina han sido identificados a través del análisis de mutantes: *pad1* (*phytoalexin deficient*), *pad2* y *pad3*, los cuales tienen efectos diferenciales en la resistencia a patógenos. El gen *pad3* codifica para una citocromo P450. Las plantas mutantes en este gen muestran mayor susceptibilidad a *C. carbonum* y *A. brassicicola* pero la mutación de este gen no tiene efecto sobre *B. cinerea*, *P. parasitica* o *P. syringae*. Las mutaciones en *pad2* y *pad3* hacen a las plantas más susceptibles a *P. syringae*. Plantas transgénicas de tabaco que expresaban constitutivamente el gen *estilbeno sintasa*, el cual permite la biosíntesis de la fitoalexina resveratol, mostraron una mayor resistencia a *B. cinerea*. Estos son solo algunos de los resultados que han dado evidencia del rol de las fitoalexinas como compuestos antimicrobianos importantes en las defensas vegetales.

## 9. GENES PR

Las proteínas PR (Pathogenesis Related) incluyen proteínas localizadas extra o intracelularmente que son inducidas y se acumulan en tejidos vegetales después del ataque por patógenos o después del tratamiento de células con elicitores (figura 25). Las proteínas PR han sido agrupadas en 14 clases de acuerdo con su serología y similitud (tabla 6). No todas las PR se activan en todo tipo de interacciones, ni están presentes en todas las especies vegetales. La actividad bioquímica para algunas de estas proteínas se conoce, pero para la mayoría aún no se sabe específicamente cuál es su actividad antimicrobiana.

**Tabla 6.** Tipos de familias de proteínas PR.

<b>Familia</b>	<b>Miembro tipo</b>	<b>Propiedad</b>
PR-1	Tabaco PR-1a	Antifúngica, antioomycete
PR-2	Tabaco PR-2a	(1 → 3)β-Glucanasa
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasa
PR-4	Tabaco R	Antifúngica
PR-5	Tabaco S	Antifúngica, antioomycete
PR-6	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteinasas
PR-7	Tomate P69	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de <i>Cucumber</i>	Quitinasa
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina de tabaco	Peroxidasa
PR-10	PR-1 de perejil	Ribonucleasa
PR-11	Quitinasa V de tabaco	Quitinasa
PR-12	Defensinas	Antifúngica
PR-13	Thioninas	Antifúngica
PR-14	Proteínas de transferencia de lípidos	Antifúngica

Las PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11 son quitinasas las cuales poseen actividades específicas sobre sustratos diferentes. Algunos experimentos dan evidencia de que estas quitinasas son capaces de degradar la quitina de hongos, lo que además de interferir con su crecimiento libera ciertos oligosacáridos que pueden actuar como elicitores para amplificar las respuestas de defensa. Algunos genes que codifican para quitinasas también han mostrado ser inducidos en respuesta al ataque por bacterias, aunque todavía no se conoce su rol en la defensa. Las glucanasas (PR-2), proteinasas (PR-7) y RNAsas (PR-10) parecen ser enzimas hidrolíticas con funciones similares. Estas proteínas pueden tener una actividad contra bacterias y hongos, y en el caso de PR-7 y PR-10 también contra virus. La PR-1 inhibe el crecimiento de oomycetes, pero su actividad bioquímica no se ha dilucidado. Sin embargo, la expresión de este gen es considerada como un marcador de la activación de las respuestas de defensa en muchos patosistemas. Las peroxidasas (PR-9) parecen estar implicadas en el refuerzo de la pared celular, mientras que las PR-12 (defensinas) y PR-13 (tioninas) se clasifican de acuerdo con su similitud con compuestos antimicrobianos conocidos y presentes en otros organismos como insectos y mamíferos. Por otra parte, aún no se ha establecido la función de las otras PR.

## 10. DEGRADACIÓN PROTEICA

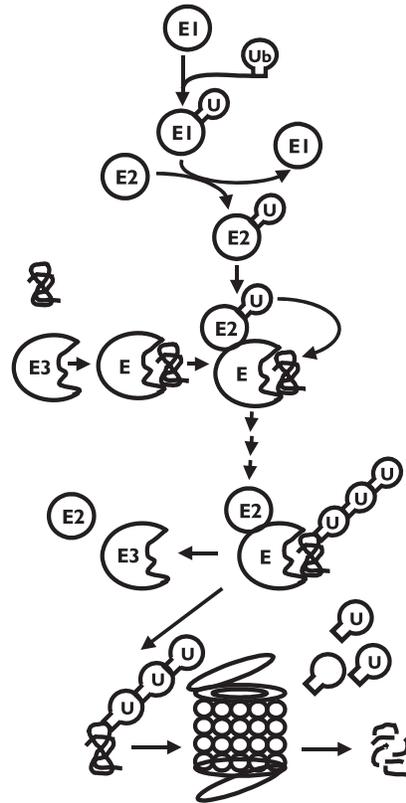
La regulación de la transcripción ha sido considerada por mucho tiempo uno de los pasos claves para regular la expresión genética. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que un punto importante en el control de la expresión

genética está determinado por la capacidad de los organismos para regular la degradación de las proteínas. Con la identificación en los últimos años del complejo Ubiquitina (Ub)-proteosoma 26S, se ha adicionado un grado de complejidad durante este proceso (figura 26). Las Ub son pequeñas proteínas conservadas de 76 aminoácidos que se unen covalentemente a proteínas blanco por medio de una cascada de reacciones que implican ATP. Las proteínas ubiquitinadas son reconocidas y degradadas por un complejo multiproteico llamado proteosoma 26S. La ubiquitinación permite la degradación de proteínas, lo que provoca la eliminación de enzimas o factores reguladores, y de esta forma se controlan las redes de señalización importantes para la fisiología de la célula. La cascada de ubiquitinación involucra tres familias de enzimas: E1, E2 y E3 ligasas (figura 26). En la reacción inicial, E1 activa la Ub a través de la hidrólisis de ATP formando un complejo E1-Ub. Posteriormente, la Ub es transferida a una E2. Este intermediario libera la Ub a la proteína blanco a través de la E3 ligasa. Por medio de rounds repetidos de conjugación, una cadena de múltiples Ubs es incorporada a las proteínas blanco (figura 26). La importancia de cada uno de estos tres pasos enzimáticos se evidencia por la complejidad genómica de los genes correspondientes. En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican *E1s*, hay al menos 45 genes *E2* y al menos 1300 genes de tipo *E3 ligasas*. Hasta el día de hoy se han identificado cinco tipos de complejos proteicos E3, basados en la composición de las diferentes subunidades: HECT, SCF, VBC-Cul2, Ring/U-box y APC. El complejo SCF E3 ligasa está formado por cuatro polipéptidos y su nombre se basó en la composición de tres de sus subunidades: SKP1, CDC53 (o Cullin) y la proteína F-box.

Una vez que una proteína blanco posee una cadena de Ubs, esta es dirigida hacia el complejo proteosoma 26S para su reconocimiento y degradación (figura 26). El proteosoma 26S está dividido en dos subpartículas: el cuerpo central 20S (CC) que posee la actividad proteasa y la partícula reguladora 19S (PR). El cuerpo central está formado por el ensamblaje de 4 anillos heptaméricos que configuran una cámara en el interior de la cual se encuentra la actividad proteasa. El acceso a la cámara es restringido por un canal que solo permite la entrada de proteínas no plegadas. Cada extremo del CC consta de dos tapas formadas por las PRs. La PR confiere la especificidad del sustrato y permite únicamente sólo la llegada de proteínas que poseen Ubs. La PR posiblemente libera las Ubs, abre la entrada y dirige las proteínas al interior del CC para su degradación. Las subunidades que forman la tapa parecen estar evolutivamente relacionadas con las subunidades CSN del COP9/señalósoma (Constitutive Photomorphogenesis 9). Es posible que los CSN puedan crear nuevas formas del proteosoma 26S al sustituir la tapa, creando así diferentes especificidades.

La degradación proteica mediada por el complejo Ub-proteosoma 26S ha revelado ser importante en una amplia gama de procesos que ocurren naturalmente en plantas, como la morfogénesis, el desarrollo floral, la embriogénesis, la

senescencia y la división celular, por citar solo algunos de ellos. Recientemente fue posible establecer una relación entre este tipo de mecanismo de regulación proteica con la respuesta de defensa de las plantas a los patógenos.



**Figura 26.** Vía de degradación proteica mediada por el complejo Ubiquitina/26S proteosoma. La vía comienza por la activación de la Ub mediada por la E1, seguida por la transferencia de la Ub a una E2 y finalmente la unión de la Ub a la proteína blanco gracias a la ayuda de una E3. Varios rounds de este proceso permiten la adición de una cadena de Ub a la proteína blanco la cual es dirigida hacia el complejo proteosoma 26S en donde ocurre su degradación.

La resistencia de *Arabidopsis* contra *P. parasitica* mediada por *RPP5* requiere de varios genes, identificados a través de análisis de mutantes, tales como *EDS1*, *PAD4* y *RAR1*. *RAR1* es particularmente especial porque también se necesita en cebada para la resistencia contra *Blumeria* mediada por el gen *Mla*. *RAR1* es una proteína que se conserva también en mamíferos y en el nemátodo *C. elegans*. *RAR1* posee dos dominios CHORD (cysteine-and histidine-rich domain). A través de tamizaje de mutantes necesarios para la función de la proteína *RPP5* en *Arabidopsis* y por análisis de doble híbrido en levadura empleando *AtRAR1* como anzuelo, fue posible identificar un gen que presentaba similitudes importantes con el gen *SGT1* de levaduras y se denominó de la misma manera.

Posteriormente se logró demostrar que *Arabidopsis* contiene dos genes *SGT1*: *SGT1a* y *SGT1b*; mientras que cebada solo posee uno de ellos. La resistencia mediada por *RPP5* requiere de *SGT1b* pero no de *SGT1a*. Mutantes de cebada en el gen *SGT1* mostraron que este gen es importante para la resistencia mediada específicamente por *Mla6* pero no por *Mla1*. Posteriormente se demostró que *SGT1* era necesaria para elicitar la RH mediada por diferentes proteínas R (Cf-4, Cf-9, Rx, Pto, RPW8).

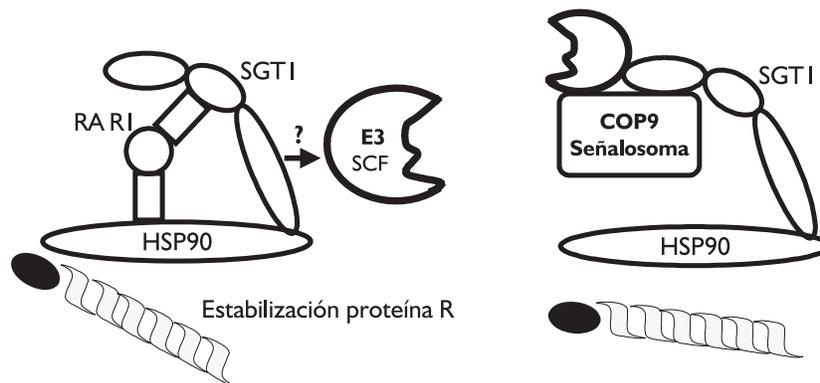
En levaduras, *SGT1* (supresor of the G2 allele of Skp1) es necesario para la progresión del ciclo celular de la fase G1/S a la fase G2/M. *SGT1* es el responsable de la degradación de SIC1 (un inhibidor de Clb5/cdc28 kinase) y CLN1 (G1 cyclin). La actividad degradativa de *SGT1* está en su capacidad de asociarse con el complejo del cinetocoro y con la ubiquitin E3 ligasa de tipo SCF (Skp1-cullin-F-box) a través de la interacción con SKP1. *SGT1* de *Arabidopsis* es capaz de reconstituir el fenotipo de levaduras mutantes en el gen *SGT1* endógeno. De esta manera se sugiere que, durante las respuestas de defensa de las plantas, *SGT1* puede tener igualmente un rol de degradación, muy posiblemente de reguladores negativos.

De manera interesante se logró demostrar que *SGT1b* de *Arabidopsis* es capaz de interactuar también con CSN4 y CSN5, dos componentes del COP9 señalosoma; y que mutaciones en CSN3 y CSN8 (dos componentes adicionales del COP9) inhiben la resistencia mediada por el gen *N* contra el TMV en *N. benthamiana*. Todos estos datos proveen evidencia de que la ubiquitinación y la degradación proteica cumplen una función importante durante las respuestas de defensa.

De manera extraordinaria se identificó, mediante análisis de estructura tridimensional predictivos, que la proteína AvrPto de *Pseudomonas* posee en su extremo C-terminal un dominio ácido (CDT) que muestra similitud estructural con E3 ligasas y que tiene una actividad ubiquitin ligasa. Mutaciones en aminoácidos específicos dentro del dominio CDT inhiben la capacidad de AvrPto de suprimir la PCD (ver capítulo VIII.B.6) y pierden la virulencia. Estos resultados sugieren que los patógenos pueden usar un sistema de mimetismo empleando las E3 ubiquitin ligasas para actuar sobre ciertas proteínas vegetales blanco y degradarlas, inactivando así las respuestas de defensa.

Recientemente se logró demostrar que RAR1, además de interactuar con *SGT1*, también es capaz de asociarse con HSP90, una proteína de choque térmico citosólica. RAR1 interactúa con la mitad N-terminal de HSP90 el cual posee el dominio ATPasa. La presencia específica de HSP90.1, una de las cuatro isoformas de HSP90, es necesaria para obtener una resistencia completa mediada por *RPS2* a *Pseudomonas* en *Arabidopsis*. En tabaco también es necesaria la presencia de HSP90 para poder activar de manera adecuada las respuestas de defensa mediadas por el gen *N*. Estos hechos sugieren fuertemente que las proteínas R se encuentran en el citoplasma de las células vegetales formando

un complejo proteico que involucra las proteínas HSP90-RAR1-SGT1 y muy posiblemente otras proteínas vegetales (figura 27). Se ha sugerido que la función de estos complejos proteicos es mantener en un estado conformacional estable a las proteínas R. Algunos datos experimentales dan sustento a esta hipótesis: la proteína RPM1 de *Arabidopsis* no es capaz de acumularse en plantas que poseen los genes *RAR1* o *Hsp90* mutados. De manera similar, la acumulación de las proteínas Rx de tomate, Mla1 y Mla6 de cebada se ve drásticamente reducida en plantas a las cuales se ha inactivado el gen *RAR1*. Se cree que la asociación directa entre *RAR1* y HSP90 permite la estabilización de las proteínas R en un estado conformacional que les permite percibir las señales producidas por el patógeno, de manera similar a como ocurre con el complejo de receptores de esteroides en animales. A partir de los últimos datos experimentales, se ha establecido un modelo para la función de SGT1 en el ensamblaje de los complejos proteicos que involucran las proteínas R. El modelo propone que las proteínas R forman parte de un complejo multiproteico “preactivado” cuyo ensamblaje requiere de la actividad cooperativa de HSP90 y RAR1. Dada la presencia de dos SGT1 en *Arabidopsis*, se ha sugerido que la actividad de proteínas R particulares depende de la presencia y cantidad específica de SGT1a o SGT1b (figura 27). En plantas de *Arabidopsis* silvestres, la principal actividad de SGT1 está determinada por SGT1b debido a su mayor acumulación y a su asociación preferencial con HSP90. En ausencia de SGT1b, la actividad de SGT1a es suficiente para permitir la acumulación de cierto tipo de proteínas R, como RPS5, pero no de otras, como RPP5 o RPM1.



**Figura 27.** Posibles complejos proteicos implicados en la estabilidad de las proteínas R. Estos complejos se basan en la interacción demostrada entre las proteínas RAR, HSP90 y SGT1.

## BIBLIOGRAFÍA

Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 55: 373-99.

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gómez-Gómez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-83.
- Austin, M. J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B. J., Jones, J. D., Parker, J. E. (2002) Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* 295: 2077-80.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295: 2073-6.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J., Shirasu, K. (2006) Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO J.* 25: 2007-16.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J. L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 391-9.
- Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E. E., Crute, I. R., Holub, E. B., Hammerschmidt, R., Ausubel, F. M. (1997) Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146: 381-92.
- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 301-8.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Gruissem and Jones Eds. Rockville.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-91.
- Hammond-Kosack, K. E., Parker, J. E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* 14: 177-93.
- Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G., McGonigle, B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotechnol.* 18: 208-12.
- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 251-275.

- Liang, X. W., Dron, M., Cramer, C. L., Dixon, R. A., Lamb, C. J. (1989) Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J Biol Chem.* 264: 14486-92.
- Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., Dinesh-Kumar, S. P. (2004) Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J Biol Chem.* 279: 2101-8.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., Stebbins, C. E. (2006) A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222-6.
- Menke, F. L., van Pelt, J. A., Pieterse, C. M., Klessig, D. F. (2004) Silencing of the mitogen activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 897-907.
- Moerschbacher, B. M., Noll, U., Gorrichon, L., Reisener, H. J. (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol.* 96: 465-470.
- Mysore, K. S., D'Ascenzo, M. D., He, X., Martin, G. B. (2003) Overexpression of the disease resistance gene Pto in tomato induces gene expression changes similar to immune responses in human and fruitfly. *Plant Physiol.* 132: 1901-12.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F. 3<sup>rd</sup>, Dangl, J. L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet.* 37: 579-609.
- Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., Somerville, S. C. (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301: 969-72.
- Peart, J. R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D. C., Schauser, L., Jaggard, D. A., Xiao, S., Coleman, M. J., Dow, M., Jones, J. D., Shirasu, K., Baulcombe, D. C. (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10865-9.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H. B., Lacy, M., Austin, M. J., Parker, J. E., Sharma, S. B., Klessig, D. F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A. B., Mundy, J. (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111-20.
- Romeis, T. (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 407-14.
- Schwechheimer, C., Deng, X. W. (2001) COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol.* 11: 420-6.

- Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2003) Complex formation, promiscuity and multifunctionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci.* 8: 252-8.
- Singh, K., Foley, R. C., Onate-Sánchez, L. (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 430-6.
- Smalle, J., Vierstra, R. D. (2004) The Ubiquitin 26s Proteasome Proteolytic Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 55: 555-90.
- van Loon, L. C., van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analyses of PR-1 type proteins. *Physiological and Mol Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Vierstra, R. D. (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* 8: 135-42.
- Wiermer, M., Feys, B. J., Parker, J. E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol.* 8: 383-9.
- Zhou, N., Tootle, T. L., Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* 11: 2419-28.

## XI. CUARTO ACTO: UN ENTRECRUCE DE DIÁLOGOS

Las respuestas de defensa inducidas en las plantas son reguladas por una complicada red de vías interconectadas en las cuales son varios los genes que están implicados y en las que señales mediadas por el AS, por el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) juegan un rol relevante (figura 24). De manera general, aunque no incuestionable, se ha considerado que frente al ataque por patógenos biotrofos las respuestas dependientes del AS son activadas, mientras que usualmente las respuestas a patógenos necrotróficos o a insectos herbívoros implican la activación de la vía del JA/ET (figura 24). El entrecruzamiento en estas vías es muy común y pueden existir efectos antagónicos y sinérgicos de unas sobre otras para optimizar la especificidad en las respuestas. Dentro del JA encontramos los jasmonatos u oxilipinas que dirigen un gran set de respuestas de defensa. Las moléculas generadas por los jasmonatos producirán una respuesta específica dependiendo del estrés. Además de su rol en las respuestas de defensa, el JA también está implicado en otros procesos de la planta, como la maduración del polen, el desarrollo de frutos y flores, la fotosíntesis y la senescencia.

La síntesis de jasmonato ocurre a través de la vía octadecanoide e implica una serie compleja de reacciones enzimáticas en las cuales están involucradas enzimas como fosfolipasas, lipoxigenasas y reductasas, entre otras. Las principales enzimas implicadas se ubican en el cloroplasto, y es poco lo que se conoce de cómo los intermediarios de las síntesis del JA se mueven entre el cloroplasto y los peroxisomas. Una vez que se ha producido el JA, este es percibido muy posiblemente por algún tipo de receptores específicos aún no identificados. Los análisis de mutantes han permitido identificar los genes *COI1* (*coronatine insensitive 1*) y *JAR1* (*jasmonate resistant 1*) como elementos importantes de esta vía. Plantas mutantes en *coi1* y *jar1* son insensibles a la inhibición por la coronatina (un análogo del JA), no expresan genes inducidos por el JA y son altamente susceptibles al ataque por insectos. *COI1* es una proteína que posee 16 LRRs y un motivo F-box. El motivo F-box está presente en los complejos Ub-proteosoma (ver capítulo X.B.10) implicados en la degradación proteica; esto sugiere que *COI1* puede actuar como un derrepresor de la vía de señalización del JA al degradar un regulador negativo específico. Consistente con esta hipótesis, recientemente se ha reportado que *COI1* puede interactuar con elementos del complejo SCF y COP9.

Los análisis predictivos de la estructura de *JAR1* indican que esta proteína pertenece a la familia acil-adenilato luciferasa cuyos miembros funcionan como enzimas que catalizan la activación de grupos carboxilos en una amplia gama de sustratos. *JAR1* adenila específicamente el JA, lo que sugiere que esta modificación es importante para la activación de esta vía de señalización.

El efecto antagonista entre la vía del AS y el JA se conoce desde hace ya varios años. Plantas con mutaciones en el gen *COI1* presentan una mayor resistencia a patógenos bacterianos debido a los altos niveles de AS, lo que permite una mayor expresión de genes *PR*, y ello sugiere que el JA puede inhibir las respuestas mediadas por el AS. Una situación similar ocurre como una estrategia de los patógenos para reprimir las respuestas de defensa de las plantas, empleando la coronatina (ver capítulo VIII.B.6). Lo contrario también ha sido reportado, es decir, la activación de las respuestas mediadas por AS puede inhibir las respuestas inducidas por el JA. Plantas de tabaco que son incapaces de expresar el gen *PAL* exhiben una respuesta SAR contra TMV más baja, pero son más resistentes a la infestación por insectos. Mientras que plantas que sobreexpresan *PAL* fueron más resistentes a TMV, pero se perdió la resistencia al ataque de insectos. Estos son solo un par de ejemplos que sugieren una acción antagónica entre las vías activadas por el AS y el JA. Sin embargo, es apenas una posible explicación, ya que puede existir otro tipo de moléculas señal aún no identificadas que estén implicadas. El significado biológico del antagonismo y el sinergismo entre estas vías aún está en su infancia y quedan muchos aspectos por conocer.

En los últimos años, estudios basados en la acción de NPR1 (ver capítulo XII. B) han sugerido que esta proteína podría estar implicada en el entrecruce de las vías mediadas por AS y JA ya que, además de activar la respuesta SAR mediada por AS, NPR1 es capaz de inactivar la vía del JA. Una función similar se ha descrito recientemente para el factor transcripcional WRKY70.

El etileno es una hormona gaseosa, frecuentemente sintetizada durante las reacciones incompatibles, pero también se produce en interacciones compatibles. Aún no se ha observado que el bloqueo de la percepción del ET o de su biosíntesis tenga un efecto sobre las reacciones incompatibles mediadas por los genes *RPM1*, *RPS2* o *N* en plantas de *Arabidopsis* o tabaco infectadas con *Pseudomonas* o con TMV, respectivamente. Sin embargo, si el ET es eliminado durante algunas interacciones compatibles, la severidad de los síntomas cloróticos y necróticos se reduce y las plantas parecen ser más tolerantes. Para activar genes como el inhibidor de proteinasas, las cutinasas y ciertos genes *PR*, se requiere tanto el ET como el JA.

El entrecruzamiento entre las respuestas mediadas por JA, AS y ET se ha estudiado a través del análisis de transcriptoma en *Arabidopsis*. Esta estrategia metodológica permitió la identificación de más de 705 ARNm inducidos o reprimidos frente a los diferentes tratamientos. Lo más interesante del estudio fue que permitió demostrar de manera global patrones de expresión coordinada por diferentes vías de respuesta activadas por JA, AS y ET.

## BIBLIOGRAFÍA

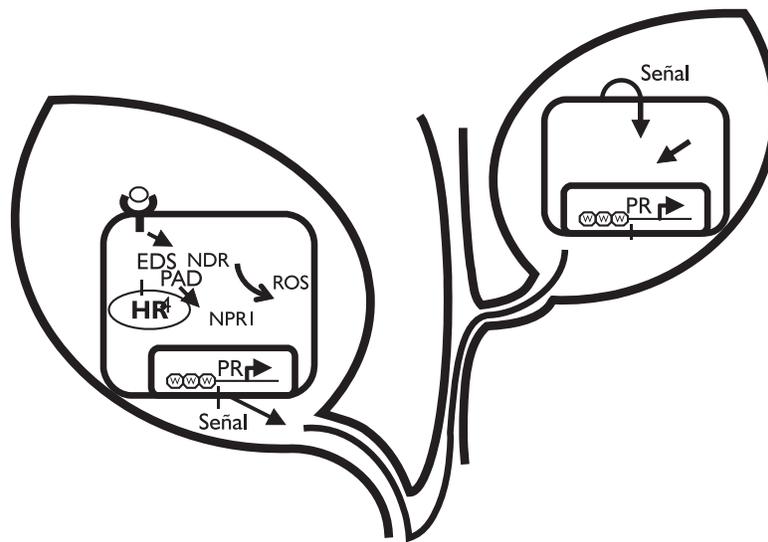
- Farmer, E. E., Almeras, E., Krishnamurthy, V. (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 372-8.
- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 301-8.
- Hammond-Kosack, K. E., Parker, J. E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* 14: 177-93.
- Li, J., Brader, G., Palva, E. T. (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319-31.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11655-60.

## XII. QUINTO ACTO: LA RESPUESTA VA MÁS ALLÁ

*“Si quiere vivir, no debe emprender ninguna ofensiva contra su enfermedad, indudablemente providencial y benéfica. Todo lo más que puedo procurarle, para ayudar sus efectos, es una segunda enfermedad”.*

Giovanni Papini. *La enfermedad como medicina.*

Las plantas no poseen un sistema inmune como el de los mamíferos. No obstante, cada célula vegetal es capaz de reconocer un agente intruso y activar las respuestas de defensa. Además, otra característica particular del sistema de defensa de los mamíferos es la memoria inmune, lo que les permite protegerse frente a posteriores infecciones. Y aunque en las plantas no se presenta este fenómeno en estricto sentido, estas sí poseen un sistema de defensa sistémico.



**Figura 28.** Activación de la respuesta SAR. La interacción entre las proteínas Avr y R en regiones locales de una planta enciende las respuestas de defensa y la generación de una molécula señal sistémica que permite la activación de genes de defensa en regiones distales de la planta, protegiéndola contra posteriores infecciones por cualquier tipo de patógenos, ya sean estos avirulentos o virulentos.

Una vez que se ha activado la respuesta de defensa de manera local, la planta es capaz de protegerse de posteriores infecciones por otro tipo de patógenos. Este fenómeno es conocido como SAR (Systemic Acquired Resistance) (figura 28). Si una planta fue capaz de activar las respuestas de defensa frente a una bacteria particular (por medio del reconocimiento R-Avr), esta tendrá una “inmunidad” frente al ataque de un amplio espectro de patógenos, como virus,

hongos u otras especies de bacterias, inclusive si la planta no posee los genes *R* correspondientes, e inclusive si esta segunda infección ocurre en regiones distantes al sitio de la primera infección (figura 28). Este tipo de inmunidad se mantiene por semanas, meses o incluso durante toda la vida de la planta. Molecularmente la SAR se caracteriza por una acumulación de AS y por la expresión de genes *PR*.

## A. ¿CUÁL ES LA MOLÉCULA SEÑAL?

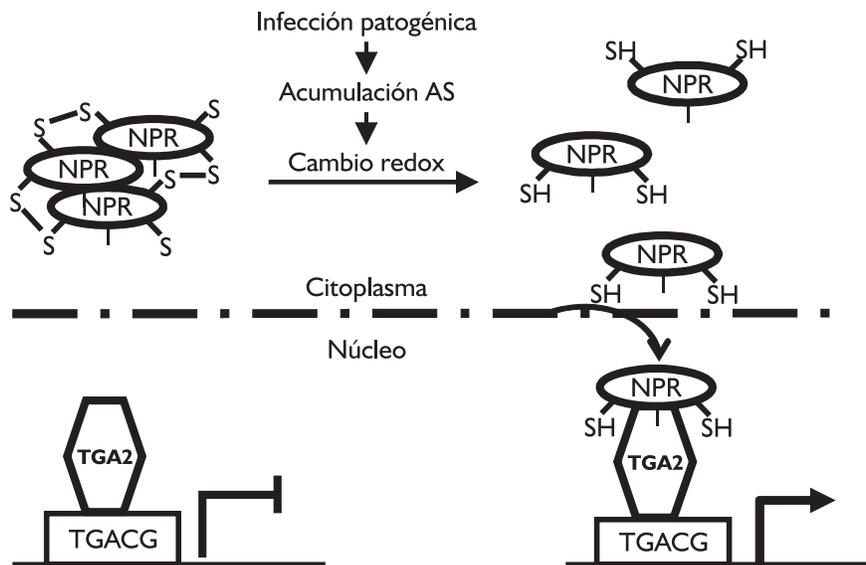
Como respuesta sistémica, durante la SAR debe existir algún tipo de molécula señal que viaje desde el sitio de la primera infección hacia todas las partes de la planta para activar las respuestas en sitios distales. Por mucho tiempo se consideró que la molécula señal era el AS, pues existe una dependencia de la activación de la SAR con la acumulación del AS. Plantas de tabaco transgénicas que contienen el gen *nahG* son incapaces de expresar la SAR. Sin embargo, experimentos que emplearon injertos de plantas normales con plantas transgénicas *nahG* demostraron que, si bien es importante para activar la SAR, el AS no es la molécula señal. Nuevos trabajos sugieren que la molécula señal posiblemente es de naturaleza lipídica. Plantas mutantes en el gen *DIR1* (*defective in induced resistance1*) muestran una resistencia local normal, pero son incapaces de activar la SAR o de expresar genes *PR* en hojas distales a la primera infección. La proteína codificada por el gen *DIR1* posee similitud con proteínas de transporte de lípidos (LTPs), lo que sugiere que esta proteína podría estar implicada en la generación o transmisión de la señal móvil. La similitud de *DIR1* con LTPs sugiere que la señal para activar la SAR podría ser una molécula lipídica. Las LTPs son una familia multigénica formada por aproximadamente 71 miembros en *Arabidopsis* y curiosamente poseen similitud con elicinas de *Phytophthora* spp, las cuales son elicitors de las respuestas de defensa de las plantas. Los receptores que reconocen los elicitors también pueden unirse a cierto tipo de LTPs. El hecho de que plantas mutantes en los genes *eds1* y *pad4* (que codifican proteínas lipasas, ver capítulo X.A) sean capaces de elicitar una RH pero no puedan activar la SAR refuerza la hipótesis de un lípido como molécula señal. Recientemente se logró identificar la proteína SABP2 (SA-binding protein) como una lipasa cuya actividad se incrementa en un orden de cuatro a cinco veces al adicionar AS. La inactivación del gen *SABP2* disminuye tanto la respuesta local como la SAR, lo que sugiere que *SABP2* podría ser el receptor del AS, aunque su posición en la vía de señalización no es clara. *SABP2* al unirse al AS podría generar una señal móvil derivada de lípidos. Otro gen, *SFD1* (Suppressor of Fatty acid Desaturase deficiency 1), codifica para una dihidroxiacetona fosfato reductasa que está implicada en la síntesis de glicerolípidos y que también parece tener un rol importante en la SAR. Plantas con mutaciones en este gen no activan la SAR, tienen bajos niveles de AS y una expresión reducida de genes *PR*. Todos estos datos recientes sugieren fuertemente que la naturaleza química de la señal móvil que induce la SAR es de tipo lipídico.

## B. NPR1

La transducción de señales que permiten activar la SAR y, en consecuencia, la expresión de genes *PR* depende en gran medida del gen *NPR1*. Históricamente, dos grupos de investigadores identificaron independientemente este mismo gen y fue denominado de manera diferente como *NPR1* (Non-expressor of Pathogenesis Related Genes 1) o *NIM1* (Non-Inducible Immunity 1) *NPR1/NIM1*. Aquí se denominará simplemente *NPR1*. La proteína NPR1 posee una repetición de ankirinas y una señal de localización nuclear, y sitios de fosforilación. La inducción de la SAR hace que NPR1 sea translocada al núcleo en donde actúa como regulador de la expresión de los genes *PR*. Sin embargo, NPR1 es incapaz de unirse directamente al ADN. Por estudios de doble híbrido se logró determinar que NPR1 interactúa con miembros de la familia de factores de transcripción TGA. Los TGA hacen parte de los factores de transcripción que poseen cremalleras de leucina y que están implicados en la activación dependiente de AS de los genes *PR*. Varios experimentos realizados por diferentes grupos han permitido identificar *i*) que la unión de NPR1 con los TGA permite incrementar la unión de estos factores de transcripción en el promotor de varios genes *PR*, *ii*) que esta interacción ocurre básicamente en el núcleo y *iii*) que la interacción entre NPR1 y los TGA es dependiente de la acumulación del AS. Análisis de mutantes simples, dobles o triples en los genes *TGA2*, *TGA5* y *TGA6* han mostrado que estos factores de transcripción tienen un rol esencial y parcialmente redundante en la activación de la expresión de genes *PR* y en la activación de la SAR en *Arabidopsis*. Diferentes miembros de la familia TGA parecen contribuir de manera específica y adicional a la regulación de la expresión de genes *PR*.

El mecanismo bioquímico por el cual NPR1 traduce la señal desde el AS a la expresión de genes *PR* y la activación de la SAR, fue recientemente dilucidado (figura 29). La proteína NPR1 es incapaz de inducir la expresión de genes *PR* por sí sola, lo que indica que NPR1 debe ser activada por algún factor o mecanismo. Recientemente se mostró que la inducción de la SAR está acompañada por un cambio en el estado redox de la célula, quizás producto de los pequeños microburst oxidativos que tienen lugar. En condiciones normales, NPR1 se encuentra inactivo formando un complejo oligomérico a través de los residuos de cisteínas las cuales forman puentes disulfuro (figura 29). Sin embargo, al cambiar el estado redox en la célula durante la SAR, NPR1 es reducido del estado oligomérico inactivo a un estado monomérico activo. Solamente en el estado monomérico, NPR1 puede activar la expresión de genes *PR* (figura 29). Mutaciones en los residuos de cisteínas que son cruciales para la oligomerización permiten la formación de NPR1 en un estado monomérico constitutivo, lo cual hace posible la localización nuclear de NPR1 y la expresión constitutiva en el gen *PR-1*. Aunque los estudios de doble híbrido permitieron la identificación de los TGA que interactúan con NPR1 como elementos reguladores importantes en la expresión de genes durante la SAR, estudios más recientes le dan mayor importancia a

la familia de factores de transcripción WRKY. Los análisis de transcriptoma de *Arabidopsis* en 14 diferentes condiciones que inducen o reprimen SAR permitieron identificar un *cluster* de 45 genes que son inducidos durante la SAR, en el cual se encuentra el gen *PR-1*, un gen marcador de la SAR. En este *cluster* de genes también se encontraban *PR-4*, *GST* (Glutation-S-Transferasa) y *PerC* (peroxidasa C). El análisis de las secuencias correspondiente al promotor disponible para 26 de los genes presentes en este *cluster* permitió la identificación de un sitio de unión para los factores de transcripción WRKY, llamado cajas W en todos los 26 promotores. Los WRKY son una familia de factores de transcripción presentes exclusivamente en plantas y están implicados en las respuestas a estrés y al ataque de patógenos. Sorprendentemente el elemento que es reconocido por los factores de transcripción TGA estaba ausente del análisis de las secuencias de estos promotores, hecho que sugiere que este tipo de factores transcripcionales no constituyen un regulador común de los genes que responden a la SAR. Otros estudios han revelado la importancia de este tipo de factores de transcripción no solo en la activación de la respuesta SAR, sino también en inducir las respuestas de defensa locales mediadas por varios genes *R*.



**Figura 29.** Activación de NPR1. En plantas antes de que ocurra la infección la proteína NPR1 se encuentra en el citoplasma en un estado oligomérico a través de puentes disulfuro. Una vez se produce la infección ocurre un cambio en el estado redox de la célula, lo que provoca la ruptura de los puentes de disulfuro y NPR1 pasa a un estado monomérico activo que permite su entrada al núcleo para la activación de los genes PR.

A partir también de análisis de transcriptoma en *Arabidopsis* se logró determinar recientemente que NPR1, además de controlar la expresión de genes *PR*, también controla la expresión de genes implicados en la vía secretora. Durante

la SAR existe una masiva síntesis de proteínas PR que van a las vacuolas y al apoplasto, razón por la cual la actividad basal de la vía secretora no es suficiente para suplir estas necesidades, y en consecuencia debe existir una inducción regulada de los genes implicados en esta vía para asegurar el correcto plegamiento, modificación y transporte de las proteínas PR. Mutaciones en algunos de los genes de la vía secretora disminuyeron la secreción de proteínas PR como PR-1 provocando que las plantas presentasen una resistencia reducida. Se demostró que NPR1 regula la expresión de los genes de la vía de secreción a través de un nuevo elemento promotor designado TL1 (CTGAAGAAGAA). El factor de transcripción implicado aún no se ha caracterizado, pero es improbable que se trate de TGAs ya que estos factores de transcripción no reconocen la secuencia TL1. Otro hecho que favorece esta hipótesis es que, si bien se observa una disminución en la expresión de los genes PR en plantas TGAs mutantes, la expresión de los genes implicados en la vía de secreción no se ve alterada. También se ha observado un mecanismo similar de inducción de expresión de genes de la vía de secreción en mamíferos, en donde la maquinaria de secreción es inducida en las células B antes de que se comiencen a secretar los anticuerpos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 547-52.
- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 301-8.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Grissem and Jones Eds. Rockville.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C. J., Cameron, R. K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399-403.
- Mou, Z., Fan, W., Dong X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-44.
- Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M., Dong, X. (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308: 1036-40.

### XIII. SEXTO ACTO: ¡SILENCIO!

*“Cada mañana, cuando hay sol y la nieve se deshace, también yo atravieso las calles nuevas, donde uno puede imaginarse que el silencio es ley para todos y me consuelo olvidando, y adoro las ventanas cerradas con rejas y cortinas, y ofrezco, a todas las miradas con que me cruzo, mi obligada grandeza de taciturno”.*

Giovanni Papini. *Conversaciones con el sordomudo.*

Las plantas han desarrollado un mecanismo novedoso para defenderse del ataque viral, que consiste en el silenciamiento génico. Aunque descrito inicialmente en plantas como respuesta a la infección viral, actualmente se sabe que este mecanismo es utilizado por varios seres vivos que incluyen hongos, nemátodos e incluso mamíferos, como sistema para regular la expresión de genes endógenos. Las bases moleculares que subyacen al silenciamiento génico solo han sido dilucidadas en los últimos ocho años. Sin embargo este fenómeno había sido observado desde 1928, cuando se describió que plantas de tabaco infectadas con un virus mostraban infección solo en las hojas inferiores, mientras que las hojas superiores eran inmunes, asintomáticas y, en consecuencia, resistentes a una infección viral secundaria. Este fenómeno se denominó *recovery* o protección cruzada.

La primera evidencia molecular sobre el silenciamiento génico también provino del estudio en plantas en 1990. Al querer obtener flores de petunia con colores más fuertes, se sobreexpresó el gen chalcona sintasa (*CHS*). Sin embargo, la sobreexpresión de este gen bloqueó la biosíntesis de antocianina y, por consiguiente, lo que se obtuvo fue lo contrario: ¡flores blancas! La sobreexpresión de este gen suprimió la expresión del gen endógeno, lo cual se evidenció por una reducción de hasta 50 veces en los niveles de ARNm del gen *CHS*. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a este fenómeno eran completamente desconocidos. Posteriormente se observaron fenómenos similares en otros organismos y se emplearon diferentes términos para definir la inactivación de la expresión a nivel de la transcripción. En hongos, el fenómeno fue denominado *quelling*; en invertebrados, como *Drosophila*, RNAi (RNA interference); o cosupresión, en el caso de paramecios; en vertebrados se ha denominado RNAi; y en plantas se empleó el término cosupresión. Actualmente se emplea indistintamente el término PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing) o simplemente silenciamiento génico.

Aunque descubierto en un principio como un mecanismo de protección de las plantas contra el ataque de los virus, actualmente se reconoce que este fenómeno es ampliamente empleado por las plantas para otro tipo de procesos, como la regulación de la expresión de genes endógenos y el control de la “invasión” genómica por sus propios transposones. En mamíferos también tiene

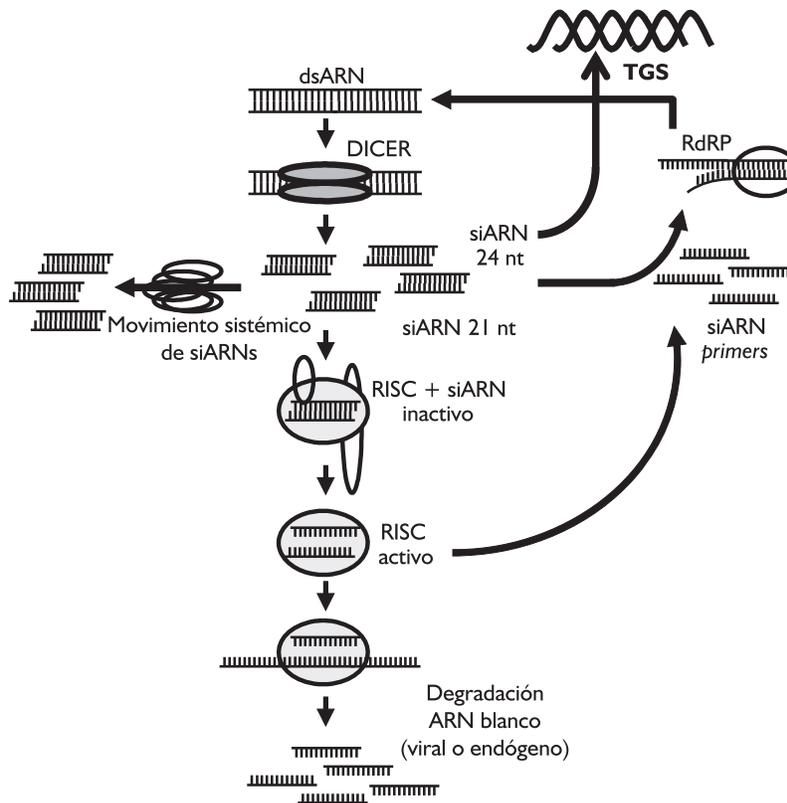
lugar un mecanismo de silenciamiento génico que regula la expresión de genes endógenos. El descubrimiento del silenciamiento de genes endógenos constituye uno de los nuevos paradigmas de regulación de la expresión genética, y es uno de los aspectos más ampliamente estudiados en los últimos años. A pesar de que existen pequeñas variantes, la base molecular del mecanismo de silenciamiento, tanto en animales como en plantas, es la misma.

## **A. LAS VÍAS DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO**

El mecanismo de silenciamiento génico es un proceso relativamente simple que puede ser dividido en etapas y que involucra diferentes actividades enzimáticas. El punto de entrada del PTGS es la producción de ARN de doble cadena (dsARN). Los dsARN son reconocidos por una ARNasa de tipo III llamada DICER, la cual produce ARN pequeños de 21-24 nt que poseen 2 nt salientes en el extremo 3' (siARNs). Estos siARNs se incorporan dentro de un complejo multiproteico denominado RISC (RNA-Induced Silencing Complexes). Dentro del complejo RISC, una helicasa separa las dos cadenas de los siARNs, lo que permite a RISC, por apareamiento de bases, reconocer las moléculas de ARN blanco, las cuales son entonces degradadas (figura 30).

El silenciamiento génico en plantas está asociado con dos tipos de siARNs según su tamaño: siARN de 21 nt y siARN de 24 nt, que parecen tener diferentes funciones. Los siARNs de 21 nt guían la degradación de ARNs blancos utilizando RISC, mientras que los siARNs de 24 nt dirigen el TGS (Transcriptional Gene Silencing). El TGS está asociado con la metilación del ADN y la supresión de la transcripción. La primera evidencia de la existencia de esta vía fue el descubrimiento de que los transgenes introducidos en plantas y los ARNs de virus dirigían la metilación del ADN. Posteriormente se demostró que la metilación en secuencias específicas del ADN es dirigida por los siARNs y que esta metilación está asociada con la modificación de las histonas. Quizás la función más probable e importante del silenciamiento del ARN a nivel de la cromatina es la protección del genoma de la "invasión" por los transposones. En animales no se ha reportado aún el fenómeno de TGS y parece que solo producen siARNs de 21 nt. Una tercera vía del silenciamiento génico en plantas es la degradación de transcritos de genes endógenos a través de moléculas microARNs (miARNs) intermediarias, las que siguen el mismo proceso de reconocimiento por el complejo RISC, el cual identifica los ARNm por complementariedad de bases para su degradación. Los miARNs son producidos a partir de un ARN precursor con repeticiones invertidas, el cual presenta algunas regiones de doble cadena. Ellos complementan a los ARNm de cadena sencilla que van a degradar. Al igual que los siARNs, los miARNs son cortos ARNs de 21-24 nt producidos a partir del ARN precursor por la enzima DICER. El silenciamiento de genes endógenos llevado a cabo por los metazoarios sigue el mismo mecanismo básico descrito para el PTGS durante la infección viral. La diferencia principal es que, en el caso de los

miARNs, estos son generados en un proceso en dos etapas que implican DROSHA y DICER, proceso que ocurre en el núcleo y el citoplasma. Una diferencia importante entre el silenciamiento endógeno de plantas y el de animales es que los miARN en plantas se aparean casi perfectamente con el ARNm blanco para degradarlo, mientras que en animales el mecanismo principal de silenciamiento es la supresión de la traducción.



**Figura 30.** Mecanismo de silenciamiento génico en plantas. Una molécula de dsARN es el punto de entrada en la vía de silenciamiento. Este dsARN es reconocido por DICER, lo cual provoca la ruptura del ARN en pequeños ARNs de 21 o 24 nt (siARN). Los siARN entran dentro del complejo RISC en donde ocurre la separación de una de las cadenas de ARN y la cadena complementaria es dirigida por complementariedad de bases a las moléculas de ARN blanco para degradarlas. Los siARN de 24 son dirigidos para activar el TGS.

Actualmente existe una colección importante de miARNs de plantas para los cuales se han identificado los ARNm blanco por análisis de bioinformática y en varios casos se han validado experimentalmente. Dentro de los genes blanco se encuentran aquellos implicados en el desarrollo y la degradación proteica; y más recientemente se ha reportado que existen miARNs que incrementan o disminuyen en condiciones de estrés abiótico y biótico.

## B. FUENTES DE DSARN

Durante el proceso infeccioso viral, los virus deben replicarse. Dado que la mayoría de virus son ARN de cadena sencilla, durante su proceso replicativo los virus forman intermediarios ARN de doble cadena (dsARN). Los dsARN virales se constituyen en el punto de entrada del PTGS en las células vegetales infectadas. En el caso de los virus de ADN, los dsARN pueden formarse al alinearse transcritos complementarios. El silenciamiento que se presenta en plantas transgénicas puede deberse a un alto número de copias transcritas a partir del transgén, lo cual ocurre debido al empleo de fuertes promotores. El segundo tipo de transgén que puede activar el PTGS son aquellos que contienen copias dispuestas como repeticiones invertidas (*inverted repeats*). Un fenómeno similar ocurre cuando la misma secuencia es clonada en orientaciones sentido y antisentido. Al transcribirse, estas moléculas de ARN, por complementariedad de bases, forman estructuras de dsARN.

## C. DICER

En *Arabidopsis* existen cuatro proteínas de tipo DICER que poseen funciones diferentes: DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4. La proteína DCL1 posee dos dominios RNasa III, el dominio de unión al dsARN, el ARN helicasa y el dominio PAZ. Esta enzima posee similitudes con DROSHA (ver más adelante) y parece funcionar en el núcleo de las células vegetales. DCL1 está implicada en la biogénesis de los miARNs de 21 nt. La proteína DCL3 produce siARNs de 24 nt a partir de los retroelementos y retrotransposones y es requerida para el silenciamiento a nivel de la cromatina. DCL4 es la única proteína DCL de *Arabidopsis* que no presenta el dominio PAZ. El dominio PAZ está implicado en la unión de los 2 nt salientes del extremo 3' de los dsARNs, por lo cual se ha sugerido que esta enzima estaría implicada en el procesamiento dsARNs largos. La función de DCL2 y DCL4 fue establecida muy recientemente. En la actualidad se sabe que el tamaño de los siARNs producto de la infección viral varía dependiendo del tipo de virus. Muchos virus inducen la producción de siARNs de 21 nt esencialmente, mientras que otros producen una mezcla de siARNs de 21 y 24 nt; otros encienden la generación de manera mayoritaria de siARNs de 24 nt o de 22 nt exclusivamente. Así por ejemplo, plantas de *Arabidopsis* infectadas con TRV generan siARNs de 21 y 24 nt, los cuales son generados por DCL4 y DCL3, respectivamente. Sin embargo, solo los siARNs de 21 nt son dirigidos para la destrucción del ARN viral. Las plantas de *Arabidopsis* que son infectadas con TCV producen únicamente siARNs de 22 nt por DCL2, lo cual permite la destrucción del ARN viral. Recientemente se logró demostrar que si el virus TCV no es capaz de bloquear la actividad de DCL4 (a través de un posible supresor del silenciamiento), los siARNs producidos por DCL4 pueden degradar el ARN de TCV. Además, se mostró que plantas de *Arabidopsis* que poseían mutaciones en DCL4, mantenían su capacidad de protección frente a TRV, gracias a la generación de siARNs produci-

dos por DCL2. Estos hechos mostraron que, aunque los siARNs producidos por un tipo de DCL4 son los predominantes, ambas DCL son capaces de producir siARNs para bloquear la infección viral. En este caso, la principal línea de defensa antiviral es controlada por DCL4. Sin embargo, la actividad de DCL2 entra a suplirla cuando la actividad de DCL4 es bloqueada por un supresor viral. Estos hechos sugieren una explicación para el número relativamente alto de genes DICER en plantas frente a solo uno en la mayoría de animales. Esta aparente redundancia puede explicarse como un mecanismo que las plantas han empleado frente a la presencia de supresores virales de silenciamiento.

#### **D. RdRP**

Las RdRPs son factores que se requieren para el silenciamiento génico. En *Arabidopsis* se han caracterizado dos RdRPs: *RDR1* y *RDR6* (también conocidas como *SDE1/SGS2*), las cuales son necesarias para el silenciamiento génico de transgenes y virus. Plantas de *Arabidopsis* que poseen mutaciones en el gen *RDR6* son más susceptibles a CMV pero no a TRV ni a TMV. Mientras que plantas de tabaco con bajos niveles de *RDR1* son más susceptibles a TMV. Estos resultados sugieren que estas proteínas tienen diferentes especificidades. La RdRP permite la generación de moléculas dsARN a partir de ssARN virales. Normalmente, los ARNm no son silenciados ya que no son accesibles a la RdRP, quizás por la presencia de la estructura Cap y la cola polyA presentes en los extremos 5' y 3', respectivamente. Las moléculas de ARN "aberrantes" que no presentan este tipo de estructuras son reconocidas por las RdRP, las cuales producen dsARNs para entrar entonces a la vía de los siARNs. Se ha sugerido que este tipo de moléculas aberrantes se pueden generar durante los procesos de transgénesis, pero no se conoce aún en detalle el origen y la naturaleza de estas moléculas aberrantes. El segundo mecanismo de acción de la RdRP requiere siARNs provenientes ya sea de un virus, de transgenes o de transposones, los cuales actúan como *primers* para dirigir la síntesis de dsARNs. La producción de nuevos siARN dirige la síntesis de nuevas moléculas dsARNs, lo que permite silenciar aun más moléculas de ARN blanco. Este proceso de amplificación es importante para el sistema de defensa viral ya que permite que el silenciamiento del ARN viral contrarreste la replicación y acumulación del ARN del virus. Dado que el PTGS es un modo de defensa sistémico contra el ataque de virus, debe existir una señal móvil. Se ha demostrado que el efecto sistémico conserva también una alta especificidad nucleotídica con la molécula dsARN inicial; se sugiere que la señal debe ser un ARN o debe contener un componente ARN. Hasta el momento no se han identificado las proteínas de la planta implicadas en el movimiento de la señal de silenciamiento. Los últimos estudios sugieren que muy posiblemente se trata de un siARN de 21 nt, ya sea individualmente o formando un complejo con algunas proteínas. De otra parte, la señal de silenciamiento puede moverse a través de los plasmodesmos.

## E. ARGONAUTA Y RISC

La proteína Argonauta (AGO) es un componente importante dentro del complejo proteico RISC. Este tipo de familia proteica se presenta en todos los seres vivos. En mamíferos, varios estudios bioquímicos genéticos y estructurales permitieron demostrar que AGO2 es la “máquina” catalítica de RISC y es directamente responsable de la degradación del ARNm; se le ha dado también el nombre de Slicer. Se piensa que AGO se une a los siARNs y a los miARNs por medio del dominio PAZ (Pili-argonaute-zwille) y que, dentro del complejo RISC, cliva la molécula ARNm blanco. En *Arabidopsis* se ha demostrado que mutantes en el gen *AGO1* son deficientes en las vías que implican siARN y miARNs, mientras que los mutantes en *AGO4* no presentan el silenciamiento a nivel de la cromatina. En *Arabidopsis* existen al menos 10 genes homólogos a *AGO*, cada uno de ellos implicado muy posiblemente en procesos de silenciamiento durante estadios de desarrollo específicos o en condiciones o células especializadas.

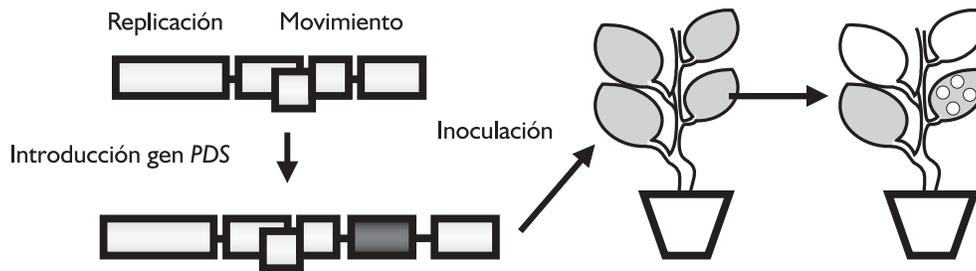
## F. SUPRESORES DEL SILENCIAMIENTO

El mecanismo de PTGS previene la acumulación viral. En consecuencia, los virus han desarrollado estrategias que les permiten romper este mecanismo de resistencia. El principal mecanismo de “contradefensa” implica la presencia de proteínas supresoras de silenciamiento, las cuales están codificadas en genes de virus de ARN y de ADN. Es muy posible que este tipo de proteínas hayan evolucionado independientemente en diferentes grupos de virus, ya que no presentan características estructurales comunes y no poseen similitud a nivel de secuencia. Las proteínas supresoras actúan a diferentes niveles durante la vía de silenciamiento. Las proteínas supresoras p21, provenientes de BWYV (Beet Western Yellow Virus) y p19 de TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus), se unen con los siARNs inactivándolos muy posiblemente de tal manera que no sean capaces de dirigirse a las moléculas de ARN viral. La proteína supresora HCPro de *Potyvirus* inhibe el silenciamiento en una etapa posterior al procesamiento del dsARN, evitando quizás el desapareamiento de los siARN dúplex o evitando su incorporación al complejo RISC. Las proteínas 2b y p25 inhiben la transmisión sistémica de la señal de silenciamiento. Se ha sugerido que los supresores de silenciamiento solo funcionan en aquellas células en las que los virus se están replicando activamente, y que pueden perder su actividad supresora una vez que los virus han completado su ciclo de vida y se han movido a células vecinas. Las proteínas supresoras que contienen los siARN pueden entonces liberarlos, lo cual permite que estén disponibles para el silenciamiento contra infecciones virales secundarias. Este mecanismo de supervivencia les posibilita a los virus proteger a su hospedero de posteriores infecciones virales, y explicaría el fenómeno de *recovery* o de protección cruzada descrito en 1928.

Sorprende que plantas de tabaco transgénicas que poseen el gen que codifica para el supresor HCPro mostraron una mayor resistencia a diversos patógenos, tales como TMV y el oomycete *P. tabacina*. La explicación más plausible para este fenómeno es que HCPro suprime la acción de miARNs o de siARNs, los cuales son dirigidos contra reguladores negativos del sistema de defensa del hospedero.

## **G. APLICACIONES DEL SILENCIAMIENTO: VIGS**

El descubrimiento y el conocimiento del PTGS han permitido desarrollar diferente tipo de aplicaciones. Una de las primeras aplicaciones que se llevaron a cabo en el campo de la agricultura fue la introducción de un transgén en tomate, el cual a través de silenciamiento previno la expresión del gen endógeno que codifica para una enzima implicada en el “debilitamiento” de las paredes celulares. Los tomates de estas plantas poseían la característica de tener un excelente sabor y podían cosecharse en estadios de inmadurez. Otra de las aplicaciones iniciales fue la introducción de genes o secuencias derivadas de virus en plantas, lo cual permitía la activación de PTGS frente a la infección de virus estrechamente relacionados con las secuencias introducidas (ver capítulo XIV.D). Sin embargo, una de las aplicaciones tecnológicas más importantes del PTGS, aplicada en el campo de la genómica funcional, es la capacidad de evaluar la función de los genes a través del estudio del efecto del silenciamiento de un gen en una especie particular. Esta estrategia se conoce con el nombre de VIGS (Virus Induced Gene Silencing). La tecnología VIGS emplea un vector viral que contiene un inserto no viral, y que puede corresponder a un gen del hospedero (figura 31). La inoculación de plantas con este vector viral producirá siARNs que son dirigidos contra el ARNm endógeno de la planta para degradarlo. El fenotipo observado en la planta infectada reflejará la pérdida de la función en la proteína codificada por dicho gen. Existen varios ejemplos que han permitido la validación de esta estrategia. Cuando vectores de TMV y PVX fueron modificados al introducirles el gen vegetal *fitoeno desaturasa (PDS)*, se observó una coloración blanca en las hojas que reflejaba la ausencia de pigmentos de tipo carotenoide que requieren del gen *PDS* (figura 31). De manera similar, la introducción de un gen que codifica para una enzima implicada en la síntesis de clorofila en un vector viral y su posterior inoculación en plantas, permitió la observación de síntomas cloróticos en las hojas. La introducción de la celulasa sintasa provocó modificaciones en la pared celular de las plantas. En el campo de la Fitopatología esta estrategia también ha sido empleada para evaluar la función de genes necesarios para la resistencia. Uno de los primeros casos que se reportaron fue la introducción del gen *EDS1* el cual fue introducido dentro del vector TRV (Tobacco Rattle Virus). Al ser el gen *EDS1* necesario para la resistencia mediada por el gen *N*, su silenciamiento provocó que las plantas de tabaco, al ser inoculadas con este vector, presentaran una mayor susceptibilidad al TMV.



**Figura 3 I.** Estrategia de VIGS. Un vector viral es modificado de tal manera que contenga el gen endógeno que se busca silenciar. Este virus es infectado en plantas, lo que permite la activación del PTGS y el gen endógeno se silenciará a través de este proceso.

El empleo del VIGS se ha realizado con mayor frecuencia en plantas de *N. benthamiana*. Esta especie presenta susceptibilidad a un amplio espectro de virus y los síntomas producidos por VIGS son más pronunciados y persistentes. Sin embargo, existen también vectores virales que pueden infectar plantas como cebada, tomate e incluso *Arabidopsis*, en algunas de las cuales se ha demostrado la posibilidad de realizar VIGS. Para poder realizar VIGS se debe contar con un virus que infecte pero que no enferme la planta; en otras palabras, el vector VIGS debe ser capaz de multiplicarse en la planta pero esta debe presentar cierto grado de resistencia, de tal forma que no se presenten síntomas de enfermedad ocasionados por la inoculación con el vector VIGS. Las ventajas de esta estrategia sobre el mecanismo de silenciamiento génico que emplea plantas transgénicas con repeticiones invertidas son varias: *i)* las repeticiones invertidas pueden ser inestables durante la propagación en bacterias; *ii)* la rapidez del VIGS, ya que los constructos virales se pueden construir en pocos días; y *iii)* el fenotipo VIGS puede ser visualizado durante las dos primeras semanas después de la infección. Con el empleo de VIGS, el ARNm será silenciado solo cuando ocurra la infección con el vector viral, aspecto que no es posible con plantas transgénicas en donde no se presenta este carácter condicional. Este hecho hace que el empleo de plantas transgénicas no permita el estudio de genes esenciales, ya que las plantas morirán en estadios tempranos del desarrollo. Todas estas características hacen del VIGS una excelente estrategia para la validación funcional de cientos o miles de genes fácilmente y a gran escala y ha sido extensamente empleada en los análisis de genómica funcional.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baulcombe, D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol.* 2: 109-13.
- Baulcombe, D. C. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-63.
- Baulcombe, D. C. (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci.* 30: 290-3.

- Bonnet, E., van de Peer, Y., Rouze, P. (2006) The small RNA world of plants. *New Phytol.* 171: 451-68.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B., Jones, J. D. (2004) Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 39: 264-72.
- Deleris, A., Gallego-Bartolomé, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., Voinnet, O. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Bartel, B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 19-53.
- Robertson, D. (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 55: 495-519.

## **XIV. ACTO FINAL: ¿TODO ESTARÁ BAJO CONTROL?**

*“Los Nuevos querían, en una palabra, defenderse, huir, exterminar al enemigo, ser vencidos, todo al mismo tiempo; y esta inseguridad se reflejaba en el desorden de sus preparativos de defensa”.*

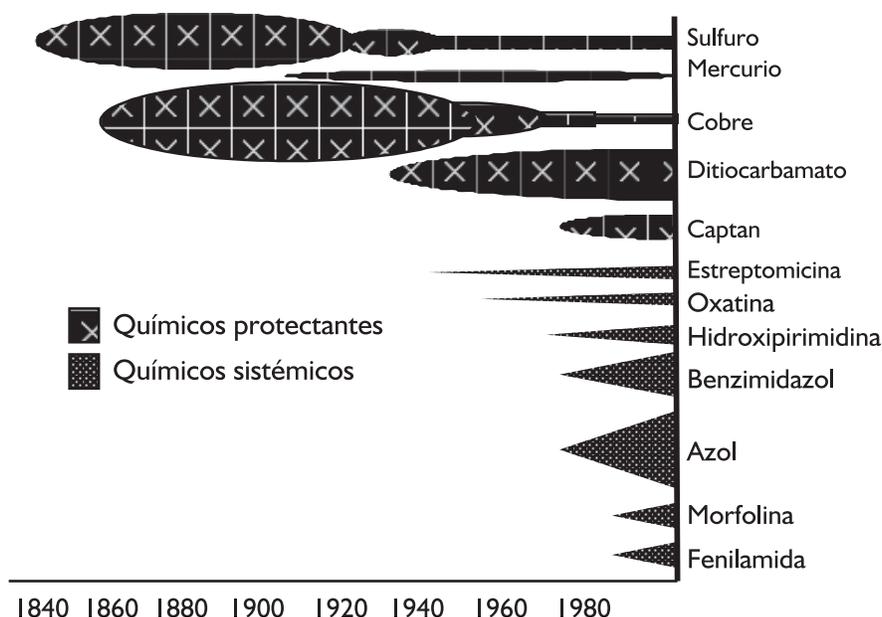
Italo Calvino. *Los Dinosaurios*.

Las plantas durante su proceso evolutivo se han enfrentado con la continua interacción con microorganismos que las han utilizado total o parcialmente como hospederos para cumplir sus ciclos de vida. Las plantas, en consecuencia, han desarrollado mecanismos relativamente sofisticados capaces de detectar los microorganismos que las afectan y de encender las respuestas de defensa. La mejor manera para controlar las enfermedades de las plantas que nos interesan o que tienen una importancia agroindustrial consiste en emplear justamente los sistemas de defensa que ellas mismas han creado naturalmente. Un mejor conocimiento y comprensión de los mecanismos de defensa propios de las plantas facilitará la búsqueda e introducción de mejores estrategias para el manejo de las enfermedades de las plantas. En este sentido son importantes los progresos que se han alcanzado en los últimos años; sin embargo, aún falta mucho por conocer y entender.

### **A. EL CONTROL QUÍMICO**

Desde que la humanidad empezó a cultivar plantas para su alimentación se enfrentó con el problema de las enfermedades que las afectaban, las cuales ocasionaban pérdidas importantes en sus cosechas. Desde entonces se han buscado estrategias para el control de los organismos responsables. Una medida de control que se ha empleado durante muchos años es la utilización de productos químicos. Actualmente estos productos son relativamente bien conocidos y difundidos. Sin embargo, es importante mencionar que este tipo de estrategia de control se ha empleado desde el siglo XIX. En 1885, Millardet describió el uso del sulfato de cobre (“caldo bordelés”) para controlar las enfermedades de los viñedos en Francia. Desde entonces son varias las sustancias químicas que se han empleado con relativo éxito para el control de las enfermedades de las plantas ocasionadas por patógenos. El gran *boom* de los productos químicos para el control de las enfermedades se dio en las décadas de los treinta a los cincuenta con la aparición en el mercado de productos para el control de hongos y de bactericidas como Thiram, Ferbam y Zineb (figura 32). Sin embargo, poco tiempo después, hacia los años sesenta, comenzaron a evidenciarse los efectos negativos del empleo de estos productos químicos. Uno de los primeros efectos fue la aparición de patógenos resistentes, lo que implicaba el incremento en las dosis, y en algunos casos ni siquiera esto era suficiente para controlar los orga-

nismos fitopatógenos. Con el libro de Rachel Carson, *Silent Spring*, se comenzó a tomar conciencia mundial de otros efectos negativos de los productos químicos como el problema ambiental y el de la salud humana. Estos hechos llevaron a que a comienzos de los años ochenta se eliminara el 80% de los productos químicos presentes en el mercado. Sin embargo, continuamente aparecen nuevos productos químicos, a pesar de que los criterios que deben alcanzar para llegar al mercado son cada vez más estrictos. Dentro de estos criterios se encuentran: *i*) que el producto sea realmente efectivo contra el patógeno blanco, *ii*) que no sea dañino para la planta, y *iii*) que sus residuos no sean peligrosos para otras plantas dentro del ecosistema, ni para el consumidor. Los productos químicos deben pasar por una serie de pruebas tóxicas y de eficacia antes de poder llegar al mercado. La rigurosidad es tal que tan solo 1 de 20.000 productos químicos potenciales puede eventualmente tener éxito en el mercado comercial. El proceso, desde su síntesis inicial en el laboratorio hasta su registro gubernamental y uso comercial, toma más de 10 años de labor investigativa, y se considera que puede llegar a costar más de 100 millones de dólares.



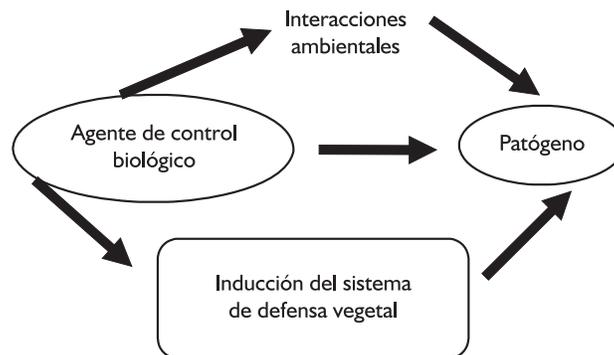
**Figura 32.** Evolución de productos químicos para el control de enfermedades.

Entre los productos químicos para el control de enfermedades podemos encontrar dos tipos: los protectantes y los sistémicos (figura 32). Los protectantes fueron los primeros en salir al mercado en los años treinta. Estos compuestos son preventivos (por lo cual deben aplicarse antes de que llegue el patógeno), no penetran a los tejidos vegetales y su función principal es inhibir la germinación de las esporas o del tubo germinal antes de la infección. Se caracterizan por tener poca selectividad y un amplio espectro. Los productos químicos de

tipo sistémico se desarrollaron en los años setenta y ochenta y son los que tienen mayor aceptación en el mercado (figura 32). Las plantas los absorben a través de su follaje o por las raíces y los translocan en sentido ascendente y por vía interna a través del xilema. Los productos sistémicos son de acción rápida ya que poseen una fácil penetración a los tejidos vegetales, no le ocasionan ningún tipo de daño a la planta y son mucho más específicos y selectivos. Estos compuestos, además de ser preventivos, son también curativos.

## B. EL CONTROL BIOLÓGICO

La toma de conciencia sobre los efectos negativos que produce el empleo de los compuestos químicos ha hecho que se busquen alternativas más amigables con el medio ambiente para el control de las enfermedades de las plantas. Una estrategia que se ha puesto en boga en los últimos años es el control biológico. La base del control biológico es la utilización de ciertos organismos o sus derivados para contrarrestar el impacto producido por los organismos patógenos. Un organismo de control biológico puede establecer diferente tipo de interacciones con los organismos patógenos (figura 33).



**Figura 33.** Diferentes tipos de interacciones que se pueden presentar entre los organismos empleados en el control biológico y los fitopatógenos.

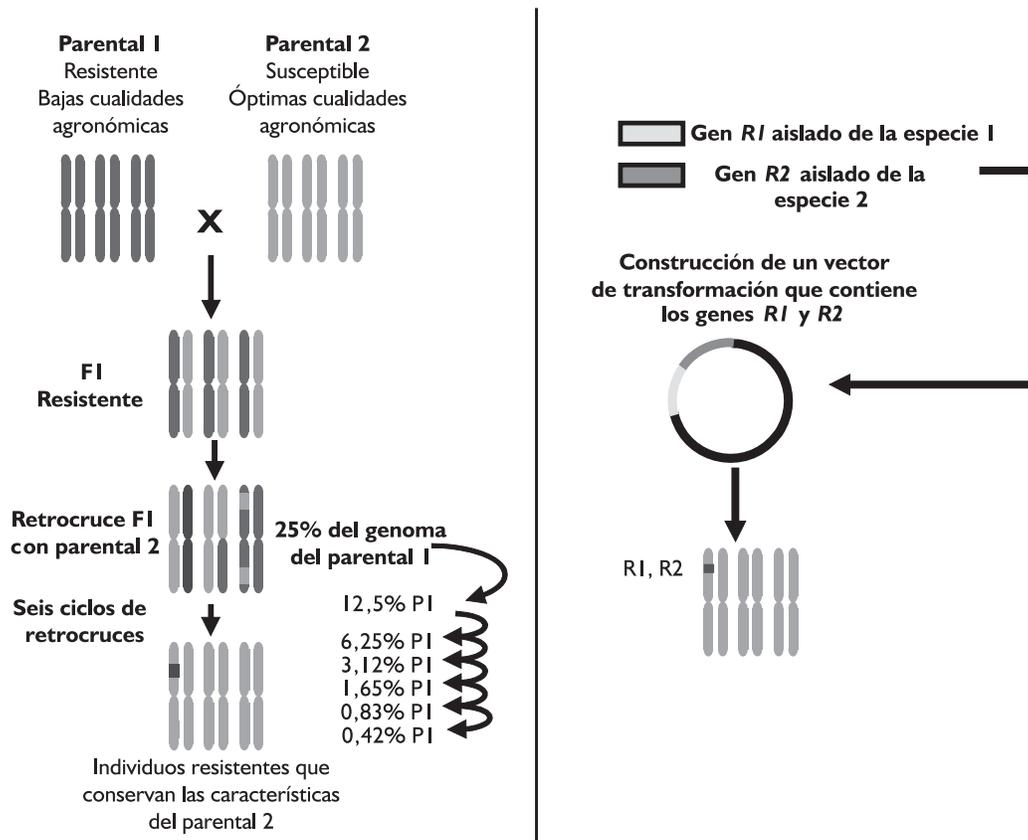
Dentro de las interacciones indirectas se encuentran: *i*) la competencia por macronutrientes presentes en el ambiente, *ii*) la producción de antibióticos u otros inhibidores que interfieran con el crecimiento y multiplicación del patógeno, o *iii*) la alteración del pH del suelo, la cual puede favorecer el crecimiento del organismo benéfico y retardar o inhibir el crecimiento del patógeno. El organismo de control biológico puede establecer asociaciones directas con el patógeno (como la generación de estructuras que le provoquen una obstrucción física) o puede ser su parásito. El organismo de control biológico puede transmitir una infección viral o simplemente ser su predador. En algunos casos el organismo de control biológico induce de manera específica las reacciones de defensa de la planta, evitando que esta sea colonizada por el patógeno, como

ocurre con las rizobacterias. A pesar de que los organismos de control biológico constituyen una alternativa ideal para el control de las enfermedades, su éxito no ha sido muy grande debido a que se trabaja con seres vivos, que presentan una variabilidad inherente que es difícil de controlar. Esto hace que las pruebas de laboratorio aunque son relativamente exitosas, cuando se llevan los productos al campo los resultados no son tan contundentes. Esta es una de las razones por las cuales los bioinsecticidas representan solo el 1% de los agentes de control en el mercado mundial. Al igual que los productos químicos, los agentes de control biológico deben reunir cierto tipo de características: ser de rápido crecimiento, ser agresivos específicamente contra el patógeno blanco y actuar en más de dos mecanismos sobre el patógeno para evitar la generación de patógenos resistentes.

### **C. MEJORAMIENTO GENÉTICO**

Desde que en 1900 se estableció que la resistencia de las plantas era un carácter genéticamente heredado, se comenzó a desarrollar una amplia gama de estrategias para, a través de cruzamientos, obtener individuos con mayores grados de resistencia. La estrategia de mejoramiento convencional ha permitido obtener variedades mejoradas con alto grado de resistencia. Sin embargo, este es un proceso que requiere varios años de trabajo y depende de las características y de los ciclos de reproducción de la especie vegetal. El mejoramiento genético clásico busca introducir genes dentro de una variedad de interés a partir de otra variedad con la característica deseada. La progenie obtenida a partir de un cruce entre una variedad llamada élite (que posee características agronómicas interesantes) y otra que posee la fuente de resistencia contendrá una gran cantidad de genes que hacen que esta descendencia sea de pobre calidad en términos agronómicos (figura 34). A través de retrocruces reiterativos entre esta descendencia y el cultivar élite se reducirá la cantidad de genes “no deseados”. Se ha estimado que aun a través de siete retrocruces reiterativos se conserva aproximadamente el 0,5% del genoma del cultivar fuente de resistencia (figura 34). Para el caso de especies con ciclos reproductivos relativamente cortos, esto se puede lograr en cerca de 5 años. Sin embargo, para otras especies de ciclos largos, este proceso puede tardar de 10 a 15 años. Solamente cuando se logre obtener líneas que posean la característica de resistencia deseada y que conserven cualidades agronómicas adecuadas, estas se podrán comercializar. Durante cada uno de los retrocruces se debe identificar cuáles de los individuos poseen la característica de resistencia deseada, lo que es dispendioso y lleva mucho tiempo. El desarrollo de la Biología Molecular ha facilitado este proceso a través de lo que se ha llamado Selección Asistida por Marcadores (SAM). La relativa facilidad actual para generar marcadores moleculares hace posible identificar alguno que esté asociado con la característica de resistencia deseada. Esto permite monitorear la presencia del marcador en la descendencia sin necesidad de realizar las pruebas de patogenicidad.

Las fuentes de resistencia empleadas con mayor frecuencia en el mejoramiento genético son las variedades silvestres no comerciales y abandonadas. El ejemplo más claro de esto está en tomate en donde los genes de resistencia *Cf-9* y *Pto* provienen de variedades silvestres, como *Lycopersicon pimpinellifolium* o *L. hirsutum*, los cuales se han introducido a través de mejoramiento clásico en *L. esculentum*, la especie comercializada de tomate. De esta forma es de vital importancia mantener *stocks* de accesiones o especies ancestrales y silvestres para asegurar una fuente potencial de genes de resistencia u otros.



**Figura 34.** Estrategias de mejoramiento genético convencional y de transgénesis. En el primer caso a través de un cruce entre dos individuos contrastantes se genera una descendencia y el retrocruce recurrente de la descendencia con el padre que presenta las características agronómicas deseadas permite al cabo de varias generaciones obtener individuos que conservan las cualidades agronómicas y la resistencia. En la transgénesis los genes *R* identificados pueden ser introducidos dentro de una variedad élite en una sola generación.

Resulta evidente que a medida que se genere una variedad con una resistencia particular a un patógeno, esta se cultivará más ampliamente, lo que producirá campos de cultivos con variedades genéticamente uniformes. Esto

lleva a que la presión selectiva “genere” patógenos que logren romper esta resistencia. La uniformidad genética del cultivo favorecerá la expansión del nuevo patógeno y, en consecuencia, se puede causar una epidemia. Por esta razón es necesario introducir de manera simultánea varios genes de resistencia, de tal manera que la probabilidad de que surgan poblaciones de patógenos capaces de romper la resistencia simultánea sea más baja. El proceso de introducir varios genes *R* de manera simultánea en una variedad particular se conoce con el nombre de “piramidaje de genes” y es la base del concepto de resistencia durable en el tiempo.

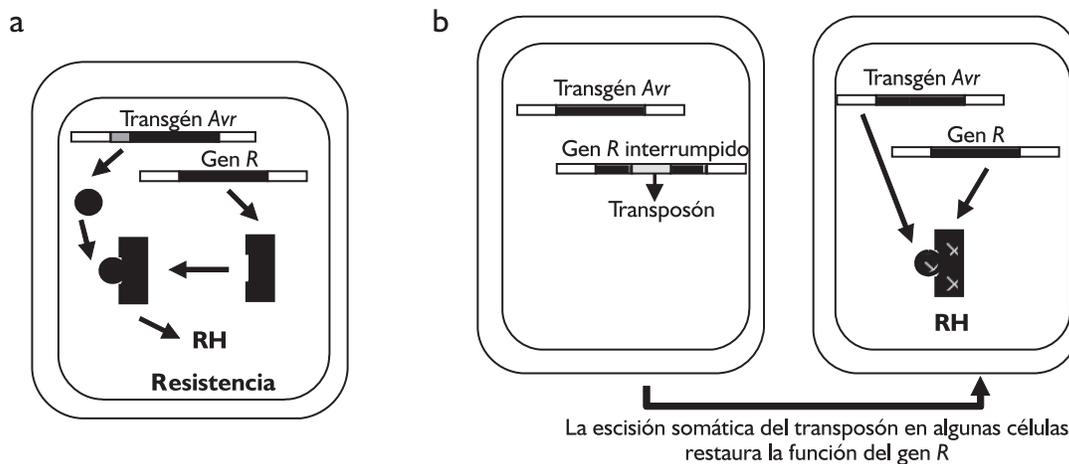
#### **D. LA FITOPATOLOGÍA MOLECULAR ENTRA EN JUEGO**

Con el conocimiento alcanzado sobre los mecanismos moleculares activados por las plantas para defenderse y de las estrategias empleadas por los patógenos para infectar, se han abierto nuevas posibilidades en el desarrollo de estrategias para el control de las enfermedades en plantas. Los programas de mejoramiento genético clásicos, si bien han arrojado buenos resultados, son dispendiosos y llevan varios años. Actualmente, con la identificación de genes *R* se hace posible su introducción mediante transformación genética en una sola generación dentro de variedades élite. La transformación también permite la introducción de varios genes *R* de manera simultánea y esto posibilita generar variedades con una resistencia durable (figura 34). La introducción de genes *R* por transformación también elimina las barreras presentadas con cruces interespecíficos que muchas veces muestran esterilidad.

El hallazgo de que los mecanismos de resistencia se encienden una vez se ha establecido el reconocimiento entre los productos de los genes *Avr* y *R* permite desarrollar una estrategia en el desarrollo de variedades resistentes. La introducción y expresión simultánea de los genes *R* y *Avr* en una misma planta permitirá encender la RH y las otras respuestas de defensa sin depender de que el gen *Avr* esté en las poblaciones de patógenos en un ambiente determinado (figura 35a). Sin embargo, si la expresión de estos dos genes se da de manera constitutiva, la RH se inducirá de manera permanente provocando la muerte no solo del patógeno sino también de la planta. Actualmente se está trabajando arduamente en la identificación de promotores inducibles que sean capaces de reconocer cualquier tipo de patógeno. De esta forma el gen *Avr* se expresará solo en condiciones de presencia del patógeno, y solo en este caso su expresión permitirá la interacción con la proteína *R* correspondiente. Sin embargo, esta estrategia debe considerar otros componentes implicados en el reconocimiento y los nuevos modelos que implican complejos proteicos e interacciones indirectas.

Otra posibilidad que se ha considerado para evitar la expresión constitutiva del gen *R* o de las respuestas de defensa es controlar su regulación a través de

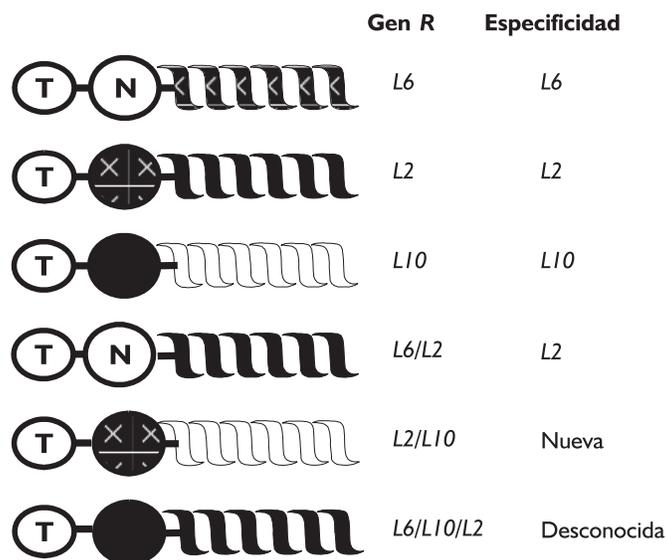
la inserción de un elemento transponible en medio de la secuencia codificadora del gen *R* (figura 35b). Durante la división celular, algunas pocas células presentarán la escisión somática del transposón, permitiendo la reconstitución de la proteína *R*. En estas células se podrá establecer el reconocimiento R-Avr y se encenderán las respuestas de defensa (figura 35b). De esta manera, la planta adulta estará formada por un mosaico genético de células, algunas de las cuales poseen el gen *R* funcional y otras no. Las pocas células en que las defensas son activadas permitirán proteger a la planta de infecciones. Esta estrategia se conoce como GEAR (Genetically Engineered Acquired Resistance). Las dos estrategias que se han mencionado son solo modelos posibles, pero todavía no se han aplicado en el mejoramiento vegetal. Vale la pena destacar que, aunque teóricas, estas estrategias descansan en el conocimiento reciente que se ha adquirido sobre los mecanismos moleculares de las interacciones entre plantas y patógenos. A medida que profundicemos y conozcamos más sobre los mecanismos moleculares de las respuestas de defensa de las plantas, se podrán establecer nuevas alternativas biotecnológicas para el control de las enfermedades.



**Figura 35.** Nuevas estrategias de mejoramiento basadas en el reciente conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia. a. Al introducir el gen de *Avr* correspondiente al gen *R* presente en una planta, la expresión de los dos genes permitirá el reconocimiento dentro de la célula y activará las respuestas de defensa. La presencia de un promotor inducible del transgén evita la expresión constitutiva de la resistencia. b. En la estrategia GEAR el gen *R* es inactivo por la inserción de un transposón, la escisión somática aleatoria del transposón restaura la función del gen *R* en ciertas células.

Una alternativa adicional es crear genes *R* con nuevas especificidades. Esta alternativa se basa en la capacidad de “intercambiar” módulos dentro de las proteínas *R*. Ya se ha mencionado que el dominio LRR está implicado en muchos casos en la especificidad hacia determinado grupo o cepas de un patógeno. Experimentos de *domain swapping*, en donde se han intercambiado dominios de

diferentes alelos de la proteína L de lino, permitieron identificar la generación de una variante con una nueva especificidad hacia un posible nuevo patógeno (figura 36). Esto abre las posibilidades de crear, a través de proteínas quiméricas y de manera combinatorial, nuevos genes *R* con especificidades particulares.



**Figura 36.** *Domain swapping* de genes *R*. El intercambio de diferentes dominios entre diferentes alelos del gen *L* de lino ha permitido la creación de variantes con nuevas especificidades.

La posibilidad de crear plantas transgénicas vino antes de la identificación de los genes *R*. Sin embargo, la modificación genética de plantas con otro tipo de genes se ha realizado desde ya hace varios años, lo cual ha permitido generar plantas con una mayor resistencia a algunas enfermedades. Los resultados más satisfactorios se han obtenido cuando se han introducido genes virales dentro del genoma de las plantas. Esta estrategia se emplea con éxito desde inicios de los años ochenta aun sin conocer el mecanismo molecular subyacente. Al introducir genes virales dentro de la planta, como aquel que codifica para la proteína de la cápside, el gen de la replicasa o la proteína de movimiento, se observó una resistencia aumentada contra el ataque viral y de amplio espectro. Actualmente se sabe que el mecanismo que se esconde detrás de este fenómeno es el PTGS, razón por la cual solo un fragmento del gen es suficiente para encender la respuesta de defensa mediada por el PTGS.

Se han creado algunas plantas transgénicas que sobreexpresan genes propios del patógeno como el gen que codifica para la OCTasa (Ornitine carabamyl transferasa), la cual es una enzima bacteriana que permite la inactivación de toxinas. La introducción de este gen en plantas les ha conferido resistencia contra *P. syringae* pv. *phaseolicola*, a través de la inhibición de la acumulación de

la toxina phaseolina producida por el patógeno. Se han generado también otras plantas transgénicas que sobreexpresan algunos genes *PR*, como quitinasas, glucanasas o enzimas que producen peróxido de hidrógeno. Las plantas obtenidas muestran solamente una mayor resistencia contra un patógeno particular, y no presentan una mayor resistencia frente a otros patógenos. Al parecer se requiere la acción concertada de varios genes que actúen sinérgicamente para obtener una resistencia completa. El problema general de estas plantas transgénicas es que la expresión constitutiva de la resistencia genera en algunos casos efectos pleiotrópicos y las plantas presentan fenotipos con características agronómicas no deseadas como baja producción, tasas de crecimiento y desarrollo anormales, razones por las cuales no han sido explotadas a nivel comercial.

Un ejemplo particular que demuestra la importancia de la identificación de los genes *R* y de los mecanismos moleculares que se encienden durante la interacción de las plantas con los patógenos es la clonación del gen *Rxo1*. Las plantas de arroz son todas ellas susceptibles a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. La búsqueda dentro de la gran colección de germoplasma de arroz en el mundo no ha permitido identificar una sola fuente de resistencia a esta bacteria. Sin embargo, el maíz presenta una resistencia no hospedero a todas las cepas de *X. o.* pv. *oryzicola*. Recientemente fue posible la clonación del gen *R* en plantas de maíz, el cual fue llamado *Rxo1*. La introducción de este gen en plantas de arroz permitió la obtención por primera vez de plantas de arroz resistentes a esta enfermedad. Esto muestra claramente cómo la identificación de genes *R* constituye un elemento fundamental para la generación de estrategias de manejo de las enfermedades.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bolognesi, C. (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 543: 251-72.
- Dickinson, M. (2003) *Molecular Plant Pathology*. Bios Scientific Publishers. London.
- Duffy, B., Schouten, A., Raaijmakers, J. M. (2003) Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu Rev Phytopathol.* 41: 501-38.
- Ellis, J. G., Lawrence, G. J., Luck, J. E., Dodds, P. N. (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell* 11: 495-506.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J. (2000). Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, Gruissem and Jones Eds. Rockville.

- Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick, H. N., Shah, J. (2006) Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol Plant Microbe Interact.* 19: 123-9.
- Whipps, J. M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 52: 487-511.
- Zhao, B., Lin, X., Poland, J., Trick, H., Leach, J., Hulbert, S. (2005) A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15383-8.

*Fitopatología Molecular*  
se terminó de imprimir y encuadernar  
en Proceditor Ltda., en diciembre de 2007.  
Se utilizaron caracteres Trebuchet de 10 puntos  
sobre papel bond blanco de 75 g.  
Bogotá, D. C., Colombia.