

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Regulación de Síntesis de Enzimas Pécticas en  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.  
Purificación y Caracterización de Pectín y Pectato Liasas.

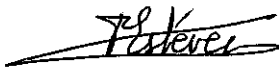


Memoria presentada para optar al  
Grado de Doctor en Biología



M<sup>a</sup> Ángeles Guevara Morato

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> Las Directoras



Pilar Estévez López



M<sup>a</sup> Teresa González Jaén

Madrid, 1997

*A mis padres*

*A Javier*

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera dar las gracias a todas las personas que de una u otra forma me han ayudado durante la realización de esta tesis y muy especialmente:*

*A los Directores de los Departamentos de Biología Vegetal I, Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba, y de Genética, Prof. Dr. Juan Ramón Lacadena Calero, por las facilidades concedidas para la realización de este trabajo.*

*A mis directoras de tesis, Pilar Estévez y M<sup>a</sup> Teresa González, por haber confiado en mí, permitirme trabajar junto a ellas y dedicarme un montón de tiempo durante estos años. A su lado he aprendido gran parte de lo que sé y, gracias a su amistad, han hecho que esta etapa haya sido menos dura.*

*A mis compañeras de laboratorio de Fisiología Vegetal. A Olvido Aguacil y Asunción de los Ríos por su ayuda en mis comienzos, por los muchos momentos compartidos y, sobre todo, por su amistad. A las que llegaron después, a Angélica Figueroa, que con su trabajo alivió el mío, y a M<sup>a</sup> Carmen Rodríguez por su ayuda cuando la necesité. A Raquel Alonso por poder contar siempre con ella. A Rosalía Ramírez y Teresa Rodríguez por todos sus consejos.*

*A todas las personas del Departamento de Genética con las que he compartido laboratorio, gracias a ellas mi trabajo en este departamento ha sido más fácil y ameno. En especial a Martha-Lucía Posada, por su optimismo, por su enorme ayuda en las épocas de más trabajo y porque algunos de los resultados que aquí aparecen se los debo a ella. A Patricia Giraldo por echarme una mano cuando podía. A Rosario Linacero por poder acudir a ella ante cualquier duda.*

*A mis padres porque gracias a su esfuerzo he podido realizar esta tesis. A mis hermanos por estar cuando los he necesitado. A Javier por ser la persona que más ha soportado mis horas bajas y más me ha animado a continuar. Al resto de familiares y amigos, por el interés que han demostrado y el cariño que he recibido de ellos.*

*A todos GRACIAS.*

## INDICE

Capítulo 1.	
Introducción general.	1
Capítulo 2.	
Producción de polisacaridasas por dos aislamientos r2 y r6 de FORL.	33
Capítulo 3.	
Regulación de liasas pécticas y poligalacturonasas por ácido galacturónico: múltiples formas.	69
Capítulo 4.	
Análisis de patrones de expresión génica en presencia de ácido galacturónico.	97
Capítulo 5.	
Obtención de sondas para poligalacturonasas y liasas pécticas. Control genético.	117
Capítulo 6.	
Purificación y caracterización de liasas pécticas.	149
Conclusiones.	179
Bibliografía.	185

## ABREVIATURAS

2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida
EDTA	Tetracetato de etilendiamino
FOL	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
FORL	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>
IEF	Isoelectroenfoque
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
NaPP	Ácido poligalacturónico (sal sódica) o polipectato sódico
PG	Poligalacturonasa
PL	Pectato liasa
PME	Pectín metilesterasa
PNL	Pectín liasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## CAPÍTULO 1.

### Introducción General.

## **1.-INTERACCIÓN FUSARIUM OXYSPORUM-TOMATE.**

### **1.1.- *Fusarium oxysporum***

El género *Fusarium* se incluye dentro del grupo de los Fungi imperfecti (Deuteromycetes), que engloba a hongos de los cuales sólo se conocen procesos de multiplicación vegetativa por conidios y agrupa al mayor número de representantes causales de enfermedades de plantas. Dentro del género *Fusarium* se agrupan doce secciones con aproximadamente 40 especies ampliamente distribuidas, siendo patógenos especialmente importantes en terrenos cultivados de regiones templadas o tropicales. *Fusarium oxysporum* es el miembro más importante de la sección Elegans. Es un hongo cosmopolita, con múltiples formas especializadas, cuyo ciclo de vida incluye un crecimiento saprofítico y un crecimiento parasitario con distintas fases cada uno de ellos (figura 1.1) (Beckmam, 1987).

La fase parasitaria se inicia con la penetración de los tejidos del huésped y entrada a su sistema vascular; a continuación se produce colonización del sistema vascular con expresión de los síntomas en la planta. La fase saprofítica de crecimiento se inicia cuando los tejidos infectados del huésped empiezan a manifestar síntomas de senescencia y a morir. Los *fusaria* vasculares, que se ramifican por el tejido vascular invadiendo vigorosamente las células del parénquima cortical, generan una substancial biomasa productora de clamidosporas. Estas clamidosporas son las estructuras que permiten a las formas patogénicas persistir en los suelos mucho tiempo después de que una cosecha susceptible haya sido eliminada del mismo (Burges, 1981). La formación de clamidosporas empieza cuando los niveles de carbohidratos descienden en los tejidos moribundos del huésped (Hsu y Lockwood, 1973). Se forman, terminal o intercaladamente, a partir de hifas, tubos germinativos o macroconidios y



generalmente están aisladas aunque ocasionalmente forman pares o cadenas. Conforme los tejidos del huésped se desintegran, las clamidosporas son liberadas al suelo, individualmente o junto con hifas en los restos vegetales. Una vez en el suelo son capaces de permanecer quiescentes durante varios años gracias a la pared fuertemente engrosada y a las reservas almacenadas, con fases de crecimiento esporádicas mientras esté disponible una fuente de nutrientes adecuada. Esta fuente de nutrientes, que puede proceder de exudados radiculares de plantas, tanto huésped como no huésped, o de desechos orgánicos en el suelo, estimula la germinación de nuevas clamidosporas. Cuando la fuente de nutrientes se agota, se forman nuevas clamidosporas con reservas frescas.



Figura 1.1. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* (Beckman, 1987).

Las distintas formas especializadas de *Fusarium oxysporum* son morfológicamente similares aunque específicas de huésped (Snyder y Hansen, 1940) y se diferencian en función de los huéspedes que pueden infectar. Algunas formas especializadas (f. sp. *betae*, *cyclaminis*, *fragariae*, *lycopersici*...) son específicas de un solo huésped, pero otras (f. sp. *apii*, *cassiae*, *vasinfectum*...) pueden infectar a varias plantas huésped (Armstrong y Armstrong, 1975). Existen también formas saprofiticas, sin capacidad parasitaria.

## **1.2. Interacción tomate-*Fusarium oxysporum*.**

### **1.2.1.- Cultivo de tomate.**

El tomate cultivado, *Lycopersicon esculentum* Mill., es un miembro del relativamente pequeño género *Lycopersicon*, perteneciente a la familia de las Solanaceas y tiene su origen en una estrecha y elongada región montañosa de los Andes en Perú, Ecuador y Chile. La domesticación y cultivo del tomate se produjo en las primeras civilizaciones de Méjico a las que se atribuye también la denominación como "tomate", aunque no alcanzó la actual popularidad hasta el siglo XIX. Su versatilidad en forma fresca o procesada y su adaptabilidad son características decisivas para su extensivo uso. El fruto de tomate, que es una fuente importante de vitaminas A y C, contiene un 94-95 % de agua y el 5-6 % restante consiste principalmente en ácidos orgánicos y azúcares que son los responsables del sabor del fruto (Jones y cols., 1991).

Las condiciones de cultivo pueden afectar a la velocidad de crecimiento, rendimiento y calidad del fruto. Los esfuerzos para la mejora del tomate durante las pasadas décadas han llevado a la obtención de numerosos cultivares para diversos ambientes, métodos de producción y uso nutritivo. Uno de los principales focos de atención en esta mejora ha sido el desarrollo de cultivares resistentes a las principales enfermedades del tomate (Jones y col., 1991).

1.2.2.- La traqueomicosis producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Una de las enfermedades más importante del tomate es la "fusariosis vascular" o "traqueomicosis" producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hans. (FOL). El síntoma más característico provocado por FOL es el marchitamiento: es una enfermedad típicamente vascular en la que la principal causa de la pérdida en rendimiento es el estrés hídrico derivado fundamentalmente de la oclusión mecánica de los vasos xilemáticos (Beckman, 1987; Bishop y Cooper, 1983b). El marchitamiento no es el único síntoma: se produce también amarilleamiento y necrosis foliar, epinastia de peciolo, hiperplasia e hipertrofia de tallos, formación de raíces adventicias, defoliación y atrofia de toda la planta. El tejido vascular se vuelve pardo oscuro aunque la médula permanece sana, las bases de los tallos afectados se alargan y las plantas mueren frecuentemente. La causa que provoca esta oclusión ha sido objeto de un gran debate (Beckman, 1987). Posiblemente se deba a tilosas, geles y compuestos fenólicos producidos por el huésped, y micelio y esporas del hongo depositados en los vasos xilemáticos, aumentando la resistencia al flujo del agua. Polisacáridos de alto peso molecular producidos por el patógeno y productos resultantes de la ruptura de la pared han sido citados también como factores que pueden contribuir a la oclusión (Bishop y Cooper, 1983b y 1984). Inicialmente, se propuso la implicación de toxinas fúngicas con actividad estimuladora de la transpiración como responsables del marchitamiento, aunque actualmente se acepta totalmente la teoría de oclusión mecánica. FOL produce ácido fusárico y licomarasmína, toxinas que aunque poseen baja toxicidad, podrían ser transportadas en el flujo de la transpiración más allá del área de infección y contribuir al desarrollo de la enfermedad (Beckman, 1987). Los demás síntomas, amarilleamiento de hojas, desarrollo de raíces adventicias, epinastia de los peciolo, hiperplasia e hipertrofia de los tallos, defoliación y atrofia de la planta entera, han sido atribuidos a la malfunción de los tejidos deshidratados y al cambio en el balance hormonal (Beckman, 1987;

Jones y col., 1991).

No existen datos concretos respecto al crecimiento saprofítico y persistencia entre cosechas de FOL pero existe la evidencia de que su comportamiento concuerda con la multiplicación y persistencia de los *fusaria* en general (Beckman, 1987). El micelio producido a partir de las clamidosporas, presentes en suelos infestados, invade las plantas de tomate a través de heridas existentes en su sistema radicular, iniciando una nueva fase parasitaria. FOL puede hacer también incursiones limitadas en la epidermis y corteza de plantas no huésped (huéspedes "tolerantes"), aunque los efectos producidos en estas plantas son mínimos. Sin embargo estas transitorias infecciones de huéspedes tolerantes pueden contribuir a la persistencia del patógeno durante períodos largos de rotación de cosechas.

Desde la primera referencia publicada sobre la marchitez producida en tomate por FOL (Masse, 1895), su presencia ha sido citada al menos en 32 países, a menudo como responsable de severas pérdidas económicas. La enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate así como de la evolución y diseminación de nuevas formas del patógeno. En el sur de Estados Unidos y en Europa la enfermedad es destructiva. Como estos patógenos, una vez establecidos, pueden persistir indefinidamente en los suelos infestados, estas enfermedades provocan serios problemas. El uso de variedades resistentes, especialmente la resistencia monogénica, ha sido y continúa siendo el principal medio de control. En aquellas zonas donde han sido cultivadas durante varios años variedades que incorporan el gen *I*, dominante para la resistencia a la raza 1 de FOL, una nueva raza del patógeno ha aparecido, la raza 2. Esta raza ha sido también satisfactoriamente controlada por el descubrimiento y posterior incorporación de un nuevo gen dominante para la resistencia, el gen *I-2*. Una tercera raza, la raza 3, inicialmente identificada en Brasil (Jones y Woltz, 1981), ha aparecido también en el sur de Estados Unidos. También se ha localizado resistencia monogénica a la raza 3 aunque aún no ha sido incorporada en variedades comerciales.

### 1.2.3.- Interacción con un nuevo patógeno

En 1969 se reconoce en Japón una enfermedad causada por *Fusarium*, que causa podredumbre en el cuello y raíz de plantas de tomate crecidas en invernadero (Sato y Araki, 1974; Yamamoto y col., 1974) y en 1971 aparece en California (Leary y Endo, 1971). Aislamientos de este nuevo patógeno afectaban a variedades de tomate resistentes a las razas 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans. En un principio se le consideró una nueva raza de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; sin embargo, las claras diferencias en los síntomas, en la temperatura óptima de infección (27°C para FOL y 18°C para el nuevo patógeno) y en el tipo de interacción, hacen que en 1978 Jarvis y Shoemaker propongan la denominación de una nueva forma especializada *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis y Shoemaker (FORL) (Jarvis y Shoemaker, 1978). Más tarde el patógeno aparece en otras zonas del hemisferio Norte: distintos estados de Estados Unidos, Canadá, Méjico, Grecia, Italia, Israel, Francia, Holanda, Bélgica y Reino Unido (Benhamou y col., 1989a). En España la enfermedad se declara en 1985 en los cultivos de tomate bajo invernadero en la región de Murcia (Tello y Lacasa, 1988).

El primer síntoma de la enfermedad es un amarilleamiento de los márgenes de las hojas más viejas, cuando el primer fruto está cerca de la madurez. El amarilleamiento va seguido de necrosis y colapso del peciolo foliar. Los síntomas progresan lentamente hacia arriba apareciendo en hojas más jóvenes. Las plantas infectadas por FORL se atrofian ligeramente, sus hojas se vuelven cloróticas y en las etapas terminales las plantas se marchitan y mueren. Pero el síntoma más característico de FORL es una podredumbre de color marrón en el sistema radicular y cuello de la planta. Todo el sistema radicular es afectado, mostrando una podredumbre parda y seca de la corteza y del xilema. Pueden desarrollarse lesiones en el tallo, en la línea del suelo o por encima, apareciendo en muchos casos una lesión necrótica que se extiende 10 a 30 cms. Después de lluvias o

durante nieblas, se produce una esporulación rosada del patógeno a partir de las lesiones necróticas expuestas (Benhamou y col., 1989a; Jones y col., 1991; Sánchez y col., 1975; Tello y Lacasa, 1988).

Las esporas de FORL se encuentran en el suelo y en el aire de los invernaderos infestados y una alta concentración de clamidosporas en el suelo sirve como inóculo. El hongo penetra en la raíz progresando por la raíz principal y raíces laterales, principalmente por medio de hifas intercelulares a través de la corteza y, secundariamente a través del xilema. El xilema aparece decolorado varios centímetros en avance del micelio (Jones y col., 1991).

Algunos aislamientos de FORL son ligeramente patógenos para *Solanum melongena* y para *Capsicum* spp. y muchas leguminosas son moderadamente susceptibles (Jones y col., 1991).

Aunque actualmente ya se dispone de cultivares comerciales de tomate que han incorporado un gen dominante para la resistencia frente a FORL (Berry y Hoakes, 1987), no se han obtenido cultivares con alto rendimiento que tengan una resistencia completa y el patógeno está causando importantes pérdidas económicas en amplias zonas del Hemisferio Norte (Beckman, 1987; Brammall y Higgins, 1988b; Kuninaga y Yokosawa, 1991; Rowe y cols., 1977; Tello y Lacasa, 1988; Vakalounakis, 1988). Otros métodos de control tampoco han resultado efectivos: los fungicidas permitidos en el mercado no resultan efectivos y otros métodos, como el uso de microorganismos antagónicos, utilización de sustancias alelopáticas o protección cruzada con aislamientos avirulentos de *Fusarium* spp., han tenido bajo grado de efectividad (Benhamou, 1992).

## **2.- PENETRACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN PLANTAS HUÉSPED**

### **2.1.- Tipos de penetración**

En las interacciones planta-hongo patógeno pueden diferenciarse tres niveles de especialización. El primer nivel incluye parásitos oportunistas que entran en las plantas a través de heridas o requieren plantas debilitadas de algún otro modo para la colonización. Estas especies fúngicas se caracterizan normalmente por un amplio rango de huéspedes y causan sólo síntomas leves. El segundo nivel incluye patógenos verdaderos que pueden penetrar en plantas vivas para crecer y reproducirse, pero que en ciertas circunstancias pueden sobrevivir fuera de sus huéspedes. En este nivel se incluyen muchos de los más serios fitopatógenos; la mayoría son altamente virulentos sobre un número limitado de huéspedes. El tercer nivel, de mayor complejidad, incluye a los patógenos obligados que requieren la planta huésped para completar su ciclo vital (Knogge, 1996).

Para colonizar las plantas los hongos han desarrollado a lo largo de la evolución estrategias que les permiten invadir los tejidos del huésped, optimizar el crecimiento en los tejidos de las plantas y después propagarse. Muchos parásitos fúngicos oportunistas suelen depender de aberturas naturales o heridas para la penetración, pero muchos hongos fitopatógenos han adoptado mecanismos que les permite atravesar activamente las barreras externas de las plantas, cutícula y paredes celulares de las células epidérmicas. Para atravesar las superficies intactas de las plantas, los hongos segregan generalmente una mezcla de enzimas hidrolíticas (cutinasas, pectinasas, celulasas y proteasas, entre otras) (Cooper, 1983). Pero como estas enzimas son también necesarias para la vida saprofitica no pueden ser consideradas como unos utensilios específicos adoptados por los hongos para la patogénesis y cada enzima individual puede no ser necesaria para la penetración. Sin embargo, es posible que la estructura o la regulación

biosintética de alguna enzima pueda estar adaptada a las necesidades específicas de un patógeno o a un huésped en particular (Knogge, 1996).

Alternativamente, o en combinación con las enzimas hidrolíticas, algunos hongos han desarrollado un mecanismo más complejo y sofisticado para penetrar mecánicamente al interior del huésped; en general, los hongos fitopatógenos forman órganos de penetración especializados llamados apresorios que se diferencian al final de los tubos germinativos y que utilizan para unirse firmemente a la superficie de la planta, en ocasiones ayudados por adhesivos extracelulares. Cuando la penetración es mecánica, en el apresorio se genera una alta presión hidrostática que es enfocada efectivamente hacia una pequeña área en la base del apresorio que está libre de material de pared; a través de este pequeño poro de penetración se desarrolla una pinza de infección que penetra mecánicamente a través de la cutícula y de la pared celular de la célula huésped, posiblemente asistida también por enzimas hidrolíticas. Una función similar es atribuida a grupos de hifas fúngicas agregadas en rizomorfos que pueden penetrar a través de la peridermis intacta de las raíces de las plantas (Aist, 1976; Knogge, 1996).

Otras especies fúngicas, incluyendo las royas, no han adoptado un mecanismo de penetración directa sino que entran a través de aberturas naturales, los estomas principalmente. En estos casos tienen gran importancia estímulos mecánicos y/o químicos presentes en la superficie de las plantas huésped que influyen en la germinación de las esporas fúngicas y en el posterior crecimiento y penetración del tubo germinativo y demás estructuras de pinza de infección (Allen, 1976; Knogge, 1996).

Por tanto, la penetración parece ser controlada por una combinación de distintos factores que pueden incluir compuestos fúngicos, estructuras de la superficie de las plantas huésped y compuestos químicos que actúan como activadores o inhibidores de la germinación de esporas fúngicas y del crecimiento de los tubos germinativos.



## 2.2.- Penetración de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* penetra en raíces de tomate a través de heridas causadas por la emergencia de raíces secundarias y adventicias (Jarvis, 1978) o también puede penetrar de forma directa atravesando la pared tangencial de las células epidérmicas de la raíz del huésped. Como se ha indicado anteriormente, la germinación de las clamidosporas quiescentes en el suelo es estimulada por la presencia de nutrientes en la rizosfera de las plantas huésped. Además parece existir una respuesta quimiotrópica de las hifas fúngicas hacia la superficie de las raíces durante la colonización de éstas y, posteriormente, para su penetración en los vasos xilemáticos (Beckman, 1987). Los estudios ultraestructurales relativos a la infección de plantas de tomate por FORL (Brammall y Higgins, 1988a, 1988b; Charest y cols., 1984), a veces complementados con técnicas citoquímicas (Benhamou y cols., 1988, 1989b, 1990a, 1990b, 1990c, 1991; Chamberland y cols., 1985, 1989) revelan que la epidermis de la raíz es colonizada entre doce y veinticuatro horas después de la infección. Posteriormente, el hongo penetra en la corteza aunque hasta las noventa y seis horas el patógeno se limita generalmente al área exterior. Noventa y seis horas después de la infección, las hifas son visibles en la endodermis desde donde se produce colonización de la estela vascular. En la colonización de la corteza radicular y estela por FORL se producen marcadas modificaciones de las paredes celulares que implican hinchamiento, desintegración e incluso en algunos casos, pérdida de material fibrilar y lamina media, con desarrollo de una lesión parda oscura, macroscópicamente visible y coincidente con la masiva colonización de la estela y disrupción de tejidos (Brammall y Higgins, 1988a; Charest y cols., 1984). FORL crece inter- e intracelularmente en la epidermis y corteza de la raíz de tomate, habiéndose observado degradación de paredes celulares a cierta distancia de las hifas (15-30  $\mu\text{m}$ ), lo que sugiere la presencia de polisacaridasas activas sobre la lámina media y las paredes primaria y secundaria. En células de

la corteza no invadidas por el patógeno, pero próximas a hifas intercelulares, se producen engrosamientos de la pared en la superficie próxima a las células fúngicas. En el citoplasma de células del huésped que han sido penetradas por el hongo, a veces moribundas, se deposita una masa de material fibrilar, entre el citoplasma del huésped y el patógeno, para taponar las áreas de la pared primaria dañadas y se forman papilas (Brammall y Higgins, 1988a).

### **3.- IMPORTANCIA DE LA PARED CELULAR EN LA PATOGÉNESIS**

La pared celular de las plantas proporciona resistencia mecánica, mantiene la forma de la célula, controla la expansión celular y el transporte intercelular, mantiene fuentes de reserva, sirve de protección contra otros organismos y está involucrada en las interacciones entre plantas y sus patógenos (Albersheim, 1976; Brett y Waldron, 1990).

Los microorganismos patógenos de plantas encuentran y penetran repetidamente las paredes celulares de sus huéspedes. La mayoría de los parásitos, aunque no todos ellos, producen enzimas que degradan las paredes celulares vegetales y que son capaces de actuar sobre la mayoría de los enlaces glicosídicos presentes en las mismas. Sin embargo, ésta no es una capacidad exclusiva de los patógenos y muchos microorganismos saprofitos las producen. Las diferentes estrategias utilizadas por los biótropos y necrótrofos se reflejan especialmente en la forma en que modifican las paredes celulares de sus huéspedes. La degradación de las paredes primarias es generalmente rápida y extensiva durante la infección por parásitos facultativos que causan necrosis y existen evidencias de que enzimas endopépticas son factores decisivos en la patogenicidad (Cooper, 1984).

### **3.1.- Estructura y composición de la pared celular de Dicotiledóneas.**

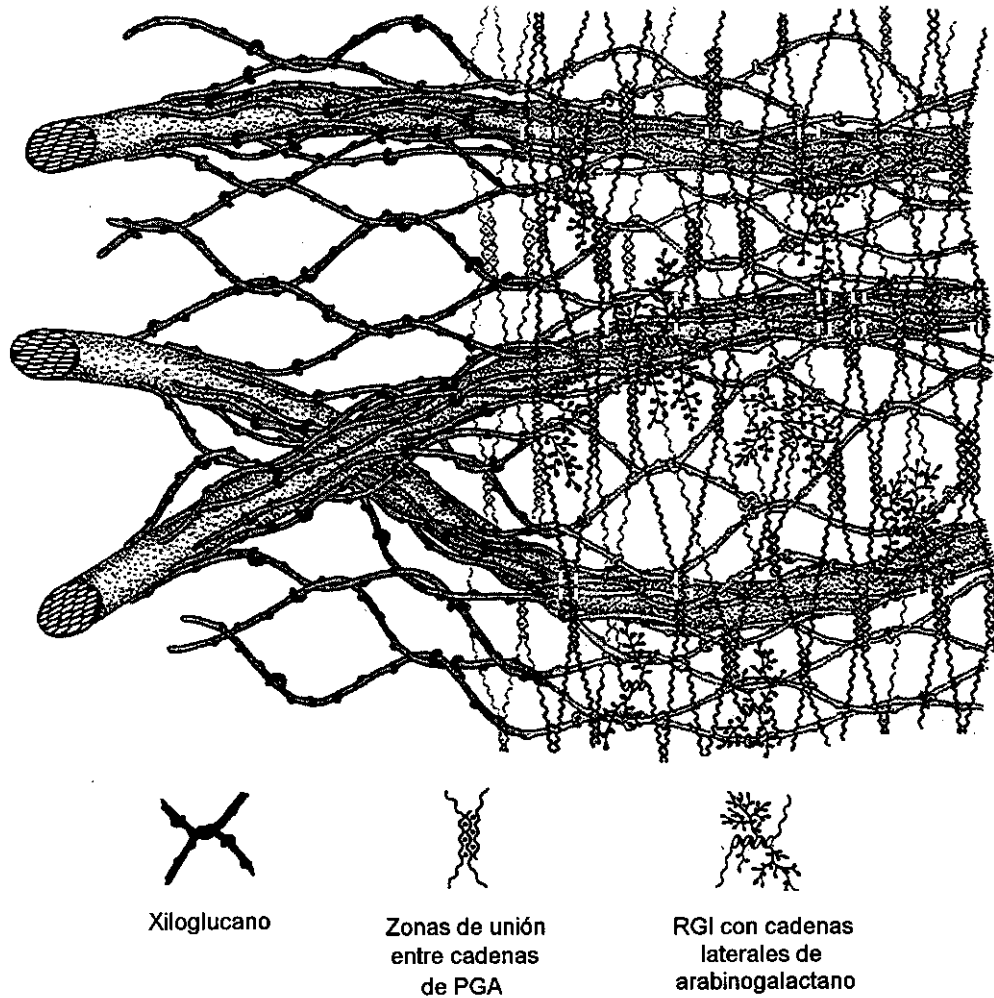
#### **3.1.1. Pared celular primaria.**

La pared celular de las plantas está compuesta por una mezcla compleja de polisacáridos y proteínas que constituyen un sistema bifásico de microfibrillas de celulosa cristalina interconectadas por una matriz amorfa (McNeil y cols. 1984).

Los modelos actualmente existentes indican que existen dos tipos fundamentales de pared celular en plantas: El tipo I, presente en todas las Dicotiledóneas y algunas Monocotiledóneas, y el tipo II, presente en las especies incluidas en la familia Poaceas y en otras familias de Monocotiledóneas próximas (Carpita y Gibeaut, 1993).

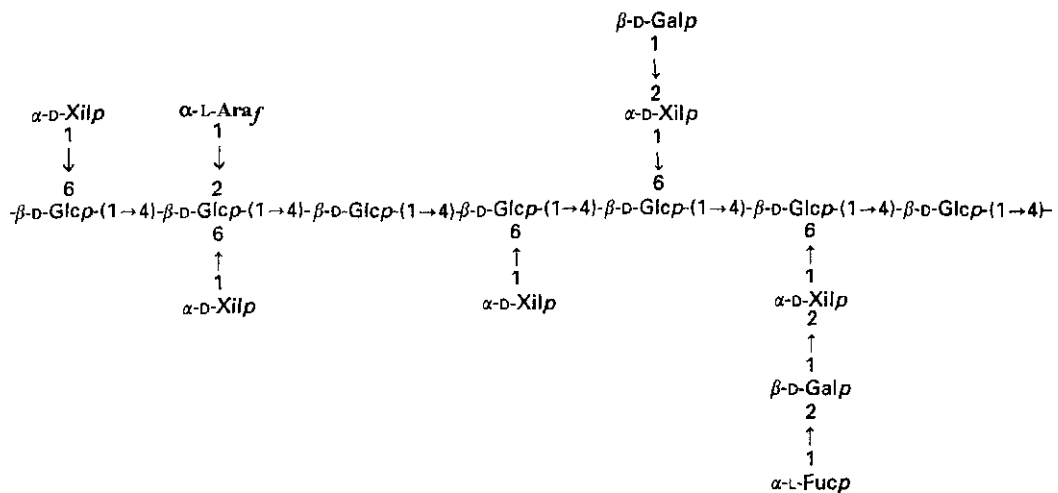
En ambos tipos de pared celular el entramado fundamental está constituido por las microfibrillas de celulosa en las que varias cadenas lineales de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucano se condensan para formar largos cristales de 5-15 nm de grosor. La estabilización de las distintas moléculas de glucano dentro de las microfibrillas se logra mediante la formación de puentes de hidrógeno entre residuos de glucosa adyacentes y entre cadenas adyacentes. El espacio entre microfibrillas, 20 a 40 nm, está ocupado por los demás componentes de la pared, que conectan las distintas microfibrillas entre sí y que presentan una composición y organización distinta en los dos tipos de pared (Carpita y Gibeaut, 1993; Darvill y cols., 1980).

En las paredes celulares de tipo I (figura 1.2) los principales polisacáridos interconectantes son los xiloglucanos. Otros polisacáridos no celulósicos, como los gluco- y galactoglucomananos, los galactomananos, los  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanos y los glucuronoarabinosilanos, que en algunas paredes primarias de tipo I contribuyen a entrelazar las microfibrillas de celulosa, suelen estar presentes en muy baja proporción (Carpita y Gibeaut, 1993).



**Figura 1.2.** Pared celular primaria Tipo I. Representación de un estrato de la pared justo después de su formación. Varios estratos como éste se unen para formar la pared. Las microfibrillas de celulosa están interlazadas con polímeros de xiloglucano, y este armazón está embebido en una matriz de polisacáridos pécticos, ácido poligalacturónico (PGA) y ramnogalacturonano (RG), el último posee pequeños grupos poliméricos laterales de arabinano, galactano y arabinogalactano. (Carpita y Gibeaut, 1993).

Los xiloglucanos son también cadenas lineales de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanos pero, a diferencia de la celulosa, presenta numerosas ramificaciones laterales de D-xilosil unidos, según un patrón regular, en posición O-6 de las unidades glucosil de la cadena de glucano. Unidades adicionales de  $\beta$ -D-galactosa y de  $\alpha$ -L-arabinosa se unen en posición O-2 de algunas unidades de xilosil. Además, la unión de restos  $\alpha$ -L-fucosa en posición O-2 de unidades galactosil lleva a la formación de cadenas alternadas de trisacáridos (Carpita y Gibeaut, 1993; Darvill y cols., 1980) (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Estructura de una unidad de xiloglucano en paredes celulares tipo I. Cadenas lineales de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanos con ramificaciones laterales de D-xilosil unidas en posición O-6 de las unidades glucosil de la cadena de glucano. Unidades adicionales de  $\alpha$ -L-fucosa-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-galactosil en posición O-2 de algunas unidades de xilosil llevan a la formación de cadenas de trisacáridos. Restos  $\alpha$ -L-arabinosil pueden aparecer unidos en posición O-2 de algunas unidades de xilosil.

En los primeros modelos de pared celular primaria de Dicotiledóneas se consideraba que los xiloglucanos adquirirían una configuración lineal estableciendo, desde el lado no substituido de la cadena, puentes de hidrógeno con los glucanos de las microfibrillas de celulosa (Albersheim, 1976; McNeil y cols., 1984). Actualmente se admite una conformación regularmente ondulada para los xiloglucanos y una doble posición en la pared: la tradicionalmente aceptada, unido fuertemente a las superficies expuestas de los glucanos de las microfibrillas de celulosa y además extendiéndose entre dos microfibrillas o entrelazando con otras cadenas de xiloglucano, lo que está más de acuerdo con la presencia de iguales cantidades de celulosa y xiloglucano en este tipo de paredes (Carpita y Gibeaut, 1993).

Las microfibrillas de celulosa interconectadas por los xiloglucanos constituyen el armazón principal de este tipo de paredes y representan un 50 % de la masa de la pared. Este armazón está entrelazado con los polisacáridos pécticos o pectinas de la pared, que constituyen un 30 % de la masa de la pared primaria y son el constituyente primario de la lámina media (Darvill y cols., 1980). Algunos de los polisacáridos pécticos constituyen los polímeros más complejos conocidos y cumplen importantes funciones en la pared, como determinar la porosidad de la pared, proporcionar cargas en superficie, que modulan el pH de la pared y el equilibrio iónico, y servir como moléculas de reconocimiento de organismos simbióticos, patógenos e insectos, induciendo respuestas adecuadas de desarrollo (Carpita y Gibeaut, 1993). En las pectinas hay dos componentes fundamentales: las cadenas de ácido poligalacturónico, que son homopolímeros helicoidales de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha$ -(1→4), y el ramnogalacturonano I que es un heteropolímero en forma de barra retorcida constituido por cadenas de  $\alpha$ -(1→4)-D-galacturonosil entremezclados con residuos de  $\alpha$ -(1→2)-L-ramnosil (Darvill y cols., 1980; Lau y cols., 1985). Existen además cadenas laterales con residuos L-arabinosil, D-galactosil, L-fucosil y probablemente galacturonosil unidos al C4 y en algunas ocasiones al C3 de la

ramnosa (figura 1.4) (McNeil y cols., 1984). Las cadenas de ácido poligalacturónico pueden contener hasta 200 unidades de ácido galacturónico y miden unos 100 nm de longitud. Sin embargo la longitud del ramnogalacturonano I no ha sido precisada porque puede ir alargada en sus extremos por cadenas de ácido poligalacturónico (Carpita y Gibeaut, 1993). Las unidades de ácido galacturónico de las pectinas pueden llevar un resto metilo substituido en el grupo carboxilo del carbono 6. El grado de metilación puede ser alto y se piensa que el ácido poligalacturónico es secretado desde la célula como un polímero altamente esterificado; posteriormente, la enzima pectín metilesterasa, localizada en la pared, hidroliza los grupos metilo dejando grupos cargados negativamente a los que puede unirse calcio (Varner y Taylor, 1989). En efecto, las cadenas helicoidales de ácido poligalacturónico pueden condensarse mediante el establecimiento de enlaces con calcio que unen dos cadenas antiparalelas; así se explica su capacidad para formar geles (figura 1.4). Aunque suele haber una acumulación de pectinas desesterificadas en la lámina media, su distribución en la pared celular varía con la etapa de desarrollo de las plantas y de forma distinta en las distintas especies. Por otra parte, las pectinas desesterificadas no están necesariamente substituidas con calcio y la mayoría de las pectinas que rodean las microfibrillas de celulosa están esterificadas. Todas estas variables deben tener una influencia decisiva en la fisiología del crecimiento (Carpita y Gibeaut, 1993).

**Figura 1.4.** Diversas estructuras de polisacáridos pécticos.

- (a) Zona de unión en "caja de huevos": tres cadenas antiparalelas de ácido poligalacturónico se unen por  $\text{Ca}^{2+}$  en regiones no esterificadas. Regiones esterificadas bloquean estas uniones
- (b) Estructura del ramnogalacturonano I. Aproximadamente un tercio de las unidades de ácido galacturónico están acetiladas en los alcoholes secundarios.
- (c) Tres tipos de cadenas laterales que se unen a las unidades de ramnosil del ramnogalacturonano: arabinanos, arabinogalactanos tipo I y arabinogalactanos tipo II.

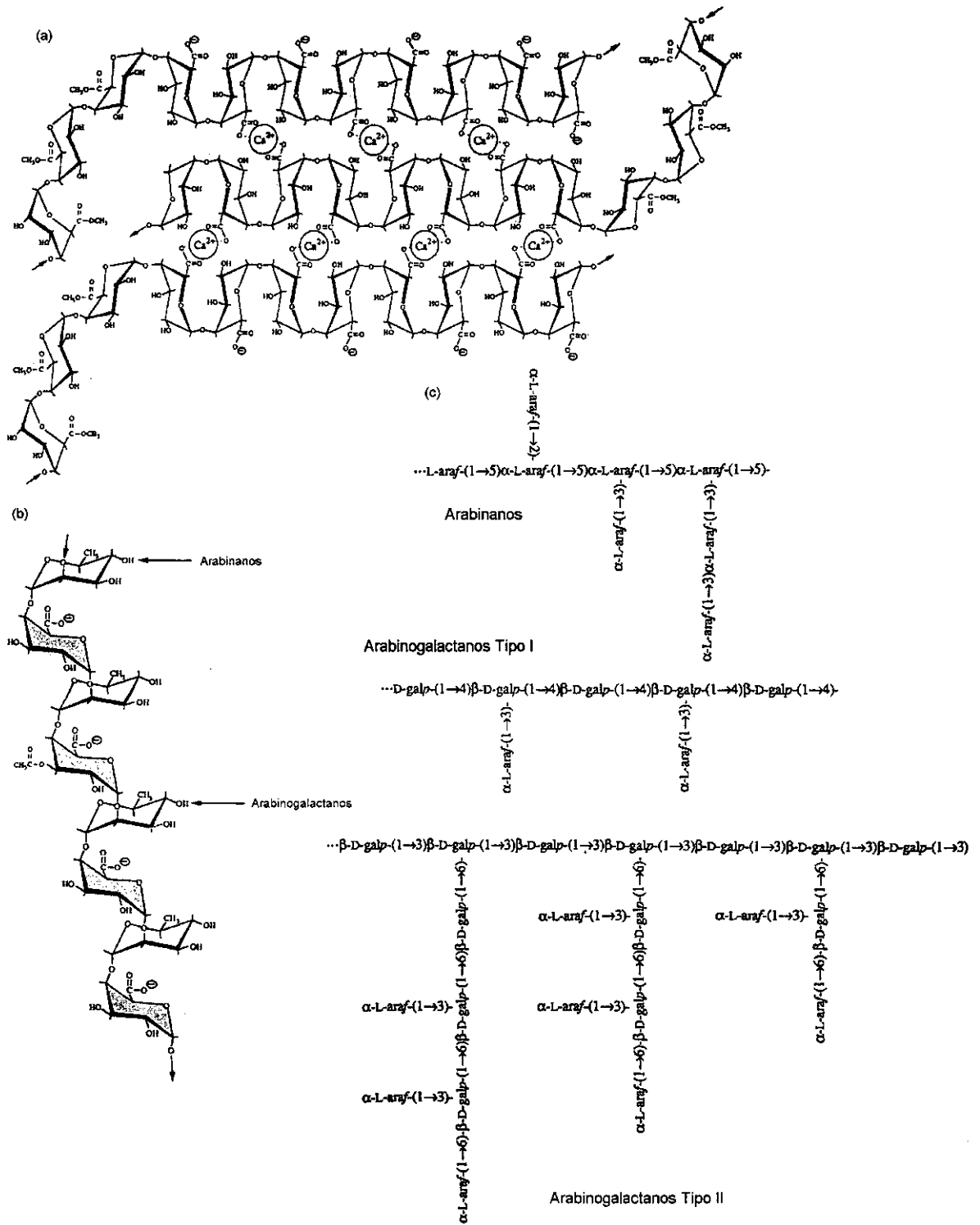


Figura 1.4.



Otros polisacáridos como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos, de diversas configuraciones, están unidos al O-4 de muchos de los restos ramnosil del ramnogalacturonano (figura 1.4). Los arabinanos están formados por residuos de L-arabinosil con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) en la cadena principal y cadenas laterales de monosacáridos con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) a la cadena (Aspinall, 1980). El galactano es principalmente un polímero lineal de residuos D-galactosil con uniones  $\beta$ -(1-4), además pueden estar presentes cadenas laterales de residuos galactosil unidos al O-6 (Darvill, 1980). Unidos a las pectinas se encuentran polímeros lineales de  $\beta$ -(1-4)-D-galactosil con residuos de arabinosa unidos al O-3 de las unidades de galactosa (arabinogalactano tipo I) (Darvill y cols., 1980). Otros arabinogalactanos altamente ramificados (tipo II) están unidos a las proteínas estructurales de la pared (Aspinall, 1980; Carpita y Gibeaut, 1993).

El tamaño de poro disponible para la difusión a través de la pared celular primaria está controlado por las pectinas y restringe el paso de moléculas con diámetro superior a 4 nm, correspondiente a 17 kDa (Baron-Epel y cols., 1988). Sin embargo, la digestión enzimática de la pectina aumenta el límite de exclusión a 10 nm, permitiendo el paso a moléculas de hasta 100 kDa (Carpita y Gibeaut, 1993).

Las principales proteínas estructurales de la pared celular son las extensinas o glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) que constan de secuencias repetitivas de cuatro unidades de hidroxiprolina (Hyp)<sub>4</sub> y de tirosina-lisina-tirosina, que llevan cadenas laterales de tri- y tetra-arabinósido unidas a las unidades (Hyp)<sub>4</sub>. Las unidades de extensina pueden unirse covalentemente entre sí y, quizás, a otras proteínas estructurales de la pared constituyendo una entidad en la pared, independiente de las otras dos entidades representadas por la celulosa con xiloglucanos y por las pectinas respectivamente (Carpita y Gibeaut, 1993). Un aumento en la cantidad de extensina en la pared celular va ligado al cese del crecimiento (Sadava y col., 1973). Otras proteínas estructurales, como las proteínas ricas en prolina (PRPs), pueden contribuir a bloquear la extensión de la

pared. La invasión por patógenos de los tejidos vegetales provoca un aumento en la síntesis de extensina y el daño mecánico lleva a un aumento en las proteínas ricas en prolina (Tierney y cols., 1988) y en otras proteínas estructurales, ricas en glicina (GRPs) (Condit y Meagher, 1987). Estos hechos han llevado a pensar que las proteínas estructurales de la pared ejercen una función de defensa frente a patógenos potenciales.

Aunque en los modelos iniciales se propone el establecimiento de enlaces covalentes entre los xiloglucanos y las pectinas, entre las pectinas y los arabinogalactanos y entre los arabinogalactanos y la extensina, en el modelo de Carpita y Gibeaut (1993) se considera que los tres dominios de la pared, la celulosa con el xiloglucano, las pectinas con los demás polisacáridos interconectantes y las proteínas estructurales, pueden estar entrelazados estabilizando la pared celular pero sin establecer enlaces covalentes entre ellos.

Se han detectado numerosas enzimas asociadas a las paredes celulares. Todas ellas son enzimas compatibles con las duras condiciones existentes en la pared celular, con pHs óptimos entre 4 y 6. Prácticamente todas son hidrolasas u oxidorreductasas. El grado de asociación de las enzimas a la pared celular puede ser muy diferente según el tipo de enzima considerado: pueden estar libremente solubles en el apoplasto o unidas iónica o covalentemente a la pared. Las numerosas glicosidasas presentes en la pared son capaces de actuar, en conjunto, sobre la mayoría de los polisacáridos de la pared celular. Las endo-glicanasas presentes en las paredes celulares son potencialmente capaces de actuar, no sólo sobre los polisacáridos de la propia pared, sino también sobre los polisacáridos de la pared de patógenos. Otras localizadas en la pared celular incluyen transglicosidasas, esterases y oxidorreductasas (Showalter, 1993; Zarra y Revilla, 1993).

### 3.1.2. Modificaciones de la pared celular durante el crecimiento y la diferenciación.

Algunos tipos de células tienen únicamente pared primaria cuando alcanzan la madurez. Sin embargo, otras células pueden sintetizar capas adicionales cuando acaba el crecimiento o modificar la pared primaria adquiriendo una pared secundaria, cuya composición y estructura puede variar ampliamente según la vía de diferenciación que siga la célula considerada. Las modificaciones más importantes son la lignificación, la suberificación y la cutinización.

La lignina es un polímero constituido por restos fenilpropanoides derivados casi exclusivamente de los ácidos p-cumárico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éter (C-O-C) o C-C. Durante el proceso de lignificación las moléculas formadas tienden a llenar todo el espacio disponible en la pared generando una malla hidrofóbica muy fuerte, que se intercala en el armazón celulósico y envuelve todos los componentes de la pared y los cementa. La lignina es una barrera efectiva para la penetración de patógenos y nutrientes ya que las células completamente lignificadas mueren y constituyen una buena protección para la planta frente a la infección (Brett y Waldron, 1990; Zarra y Revilla, 1993). Las paredes celulares secundarias lignificadas son características de la madera en dicotiledóneas y gimnospermas. Son ricas en microfibrillas de celulosa, altamente organizadas en haces paralelos, lo que aumenta considerablemente su rigidez. Los polisacáridos no celulósicos, fundamentalmente glucomananos y xilanos presentan bajo grado de sustitución posiblemente indicando un mayor grado de asociación a la celulosa. La lignina se encuentra principalmente en el esclerénquima y en las traqueidas y vasos del xilema, pero también aparece en otras células en respuesta a la infección por patógenos u otros estímulos externos (Brett y Waldron, 1990; Zarra y Revilla, 1993).

La cutina es el principal componente de la cutícula. Se encuentra depositada sobre su superficie así como impregnando las paredes externas de las

células epidérmicas de las partes aéreas de las plantas. Es una mezcla compleja de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, generalmente hidroxilados. Estos grupos hidroxilo están esterificados con ácidos como ferúlico o p-cumárico, dando lugar a una compleja red tridimensional.

La suberina está presente en las paredes de la peridermis, y en las superficies de raíces y tallos, así como en la banda de Caspari. Está constituida por ácidos fenólicos esterificados a ácidos grasos de cadena larga (C14-C30), ácidos dicarboxílicos y w-hidroxiácidos.

El carácter hidrofóbico de la cutina, suberina y las ceras reduce de forma importante la permeabilidad al agua y los solutos, estableciendo una barrera física que evita su pérdida.

### **3.2.-Tipos de enzimas degradadoras de pared celular.**

La mayoría de los organismos fitopatógenos producen polisacaridasas que pueden alterar o degradar los distintos polisacáridos presentes en las paredes celulares de plantas superiores. Durante la invasión de los tejidos del huésped, las paredes celulares son normalmente rotas repetidamente por el patógeno, especialmente en el caso de los hongos. Las enzimas que facilitan la penetración, la maceración tisular y la disgregación de la estructura de la pared son producidas por la mayoría de los hongos y bacterias fitopatógenos (Bateman, 1976; Knogge, 1996).

Las enzimas que degradan la pared son a menudo glicoproteínas extracelulares de bajo peso molecular. Una actividad puede ser representada por múltiples formas o isoenzimas que difieren en la carga, tamaño, regulación, estabilidad frente a factores del huésped y capacidad de degradar el sustrato (Cooper, 1983).

Sobre los diversos polímeros de ácido galacturónico, que forman el material pectídico de la pared celular, actúan dos grupos de enzimas que catalizan, o su

despolimerización por ruptura del enlace  $\alpha(1-4)$  o la desesterificación por hidrólisis del grupo metilo substituido en el carbono 6 de las unidades de ácido galacturónico. Las primeras se pueden clasificar de una forma sencilla según el mecanismo de degradación (hidrolasas y liasas), según la forma de ataque, si es al azar, en zonas internas ("endo") o terminal ("exo") y según la especificidad por el polímero esterificado (pectina) o no esterificado (ácido poligalacturónico o pectato). Las liasas rompen el polímero péctico por  $\beta$ -eliminación, generando un residuo con un enlace insaturado entre los carbonos cuatro y cinco del extremo no reductor de la molécula. Tienen un parcial o completo requerimiento del ión calcio y normalmente pH óptimo alcalino (8-10). Cuando tiene lugar la degradación de sustratos no esterificados se denominan pectato liasas, y pueden romper los enlaces glicosídicos al azar, endopectato liasas (EC 4.2.2.2, poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosiduronato liasa), o en zonas terminales comenzando por el extremo reductor de la molécula, exopectato liasas (EC 4.2.2.10, poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosiduronato exoliasa). Cuando degradan sustratos altamente esterificados se denominan pectín liasas (EC 4.2.2.9, poli(metil D-galactosiduronato) liasa); en este caso solamente se conocen enzimas que rompen el sustrato al azar, endopectín liasas. No obstante, se han descrito liasas que pueden actuar sobre sustratos esterificados y no esterificados. Algunos autores sugieren que ambos tipos de enzimas se consideran pectín liasas y pueden distinguirse según su preferencia por pectinas de bajo o alto grado de metilación (Rexová-Benková y Markovic, 1976; Cooper, 1983). Las poligalacturonasas son las hidrolasas que generan extremos reductores; son más activas a pH ácido (4-5) y pueden ser inhibidas por el ión calcio (Cooper y col., 1978). Pueden romper los enlaces glicosídicos al azar, (EC 3.2.1.15, poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosiduronato glicanohidrolasa), o en zonas terminales, (EC 3.2.1.82, poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galactosiduronato glicanohidrolasa). Existe un grupo de hidrolasas que rompen el penúltimo enlace glicosídico empezando por el extremo no reductor, liberando D-galactosiduronato (Rexová-Benková y Markovic, 1976). Finalmente, algunas

hidrolasas y liasas degradan zonas terminales de oligo-D-galactosiduronatos, siendo su preferencia por el sustrato inversamente proporcional a la longitud de la cadena; se han llamado oligogalacturónido hidrolasas y oligogalacturónido liasas (Rexová-Benková y Markovic, 1976)

La clasificación en formas "endo" o "exo" no se ajusta siempre a la realidad, algunas enzimas tienen un ataque múltiple. Con un comportamiento "endo" pueden liberar oligómeros o monómeros como la PG de *Verticillium albo-atrum* (Cooper y Rankin, 1978), la de *Sclerotium rolfsii* (Bateman, 1972) y la de *Colletotrichum lindemuthianum* (English y col., 1972). Estas enzimas atacan a la cadena de ácido poligalacturónico al azar y a continuación van liberando trímeros, dímeros o monómeros hasta que alcanza un punto en el que no puede seguir. En este punto la enzima puede soltarse y saltar a otra cadena. En *Colletotrichum lindemuthianum* se ha purificado una poligalacturonasa con un modo de acción más o menos "endo" dependiendo del pH de la mezcla de reacción (Keon y Waksman, 1990).

Mecanismo	Sustrato	
	Pectina	Pectato
Hidrólisis	Polimetilgalacturonasa (PMG)	Poligalacturonasa (PG)
$\beta$ -eliminación	Pectín liasa (PNL)	Poligalacturonidoliasa o Pectato liasa (PL)

Tabla 1.1. Tabla resumen de las principales enzimas pécticas.

Los grupos metilo de la pectina son liberados por la pectín metilesterasa (PME) (EC 3.1.1.11) favoreciendo la actuación de las poligalacturonasas y pectato liasas sobre sustratos metil esterificados (Cooper, 1983).

Para la degradación de celulosa se requiere un complejo enzimático. Los sistemas celulasa producidos por la mayoría de los hongos incluyen endoglucanasas (EC 3.2.1.4,  $\beta$ -1,4-D-glucanohidrolasa), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91,  $\beta$ -1,4-D-celobiohidrolasa) y  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21,  $\beta$ -glucósido glucohidrolasa). Con algunas excepciones, son inactivas frente a la celulosa cristalina cuando intervienen aisladamente; las endoglucanasas y las exocelobiohidrolasa cooperan para efectuar la hidrólisis de la celulosa cristalina. Las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan oligosacáridos solubles, incluyendo celobiosa, con la correspondiente liberación de glucosa; esto evita la acumulación de celobiosa que es un inhibidor de la celobiohidrolasa, aumentando así la velocidad de degradación de la celulosa. Las endoglucanasas hidrolizan celulosa amorfa y derivados solubles como carboximetilcelulosa (CM-celulosa). El ataque a la celulosa amorfa se caracteriza por ruptura al azar de los enlaces  $\beta$ -glicosídicos (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

### **3.3. Degradación de la pared celular de plantas en interacciones con microorganismos. Importancia de las enzimas pécticas.**

Los microorganismos fitopatógenos necesitan atravesar las paredes celulares de sus huéspedes para proliferar en el apoplasto y/o tener acceso al protoplasto. Como el límite de exclusión de los intersticios de la pared, es demasiado pequeño para permitir incluso el paso de virus, la degradación de la pared tiene un interés primordial y, debido a la variedad de componentes y enlaces presentes en la misma, implica la participación de distintas enzimas específicas.

Las enzimas pécticas, producidas por muchos microorganismos asociados a plantas, tienen un papel muy importante en el parasitismo, en interacciones en

las que están involucrados patógenos de dicotiledóneas, ya que en éstas el ramnogalacturonano juega un papel importante en la estructura de la pared celular (Cooper, 1983). Cuando microorganismos productores de varias enzimas activas sobre los polisacáridos presentes en la pared celular de dicotiledóneas se enfrentan con paredes celulares poco modificadas, las enzimas pécticas son las primeras en ser detectadas; esto refleja que los polímeros de ácido galacturónico están más accesible en la pared celular y demuestra la importancia de estas enzimas en el inicio de la degradación de paredes celulares (Cooper y Wood, 1975). La celulasa aparece sólo en los últimos estados de la infección, de acuerdo con la localización de la celulosa en la pared celular.

La movilidad que las enzimas pécticas tienen a través de las paredes celulares puede depender de la posición de su sustrato en la pared celular y de su estructura. La estructura tridimensional de varias pectato liasas se ha visto que está formada por cadenas  $\beta$  paralelas en una hélice dextrógira. El motivo de la  $\beta$ -hélice puede aparecer en pectín liasas y otras enzimas pécticas (Yoder y col., 1993.).

La degradación enzimática de la pared por parte de los patógenos no sólo es importante para la penetración y colonización de los tejidos, sino que es necesaria también para la obtención de nutrientes. Las enzimas con actividad "endo" son capaces de producir maceración y, por tanto, destrucción de tejidos, mientras que las que poseen actividad "exo" proporcionan nutrientes al patógeno a partir de las sustancias pécticas de la pared del huésped (Bateman, 1966; Bateman y Bashman, 1976; Cooper, 1983).

Algunas moléculas potencialmente nocivas para las plantas están unidas a la pared y pueden ser liberadas o expuestas después de su degradación (Cooper, 1984). Los fragmentos pécticos, liberados por la acción de enzimas pécticas, pueden formar geles taponando los vasos xilemáticos y contribuyendo al estrés hídrico típico de las marchiteces vasculares. Otros síntomas que pueden originarse indirectamente de la degradación de paredes celulares son la abscisión y epinastia,



provocadas por el aumento en etileno, y clorosis, debida a la generación de peróxido de hidrógeno, ambos consecuencia de la liberación de glucosa oxidasa. La decoloración vascular es consecuencia de la solubilización de peroxidasas (Cooper, 1984).

Además las enzimas pécticas pueden estar directamente implicadas en el reconocimiento entre plantas y patógenos. Las bases moleculares del reconocimiento de los potenciales patógenos por las plantas se conocen pobremente excepto en los casos en los que un gen de resistencia de la planta huésped interacciona específicamente con un gen de avirulencia del patógeno. Las plantas pueden reconocer un agresor mediante factores extraños presentes en la superficie del patógeno o secretados por él y/o mediante compuestos que sean liberados por el patógeno invasor, por ejemplo, mediante la actividad de enzimas hidrolíticas que inducen la liberación de fragmentos de pared celular (oligogalacturonatos) (Baron y Zambryski, 1995). Después del reconocimiento del patógeno, una multitud de reacciones de defensa de la planta se inician y la resistencia o susceptibilidad se determina después de un intercambio secuencial de señales entre huésped y patógeno. Entre los mecanismos de defensa de la planta a la infección se incluyen: modificación de sus paredes celulares, producción de fitoalexinas, síntesis de enzimas tales como  $\beta$ -glucanasas y quitinasas, síntesis de inhibidores de proteasas y muerte celular hipersensible (Boller, 1985; Dixon y col., 1994; Esquerré-Tugayé, 1979; Grisebach y col., 1985; Ryan y col., 1985). La modificación de las paredes celulares, que dificulta la penetración de los patógenos, puede implicar lignificación, acumulación de proteínas ricas en hidroxiprolina y depósito de calosa (formación de papilas). Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, que se sintetizan y acumulan en las plantas después de la exposición a microorganismos. La muerte celular hipersensible puede definirse como la necrosis rápida y localizada en el lugar de la infección. A partir de numerosos hongos han sido aisladas moléculas, elicitores, que desencadenan la mayoría o, al menos algunas,

de estas reacciones defensivas (Ebel y Cosio, 1994).

El reconocimiento del patógeno puede ocurrir como resultado de la liberación de fragmentos de pared celular después de la degradación de las paredes celulares del huésped por los organismos parásitos y la capacidad de las células del huésped para percibir estos fragmentos, posiblemente en el plasmalema. La ruptura de un polisacárido puede liberar pequeñas moléculas activas de la pared celular que podrán alcanzar los sitios receptores. La acción de una enzima sobre la pared celular puede ser esencial para el reconocimiento. Una degradación continuada del sustrato polisacárido podría destruir la actividad elicitora, limitando la actividad y la correspondiente respuesta del huésped, en el tiempo y el espacio. Entonces, una enzima estratégicamente utilizada de forma controlada puede ser esencial en el proceso de reconocimiento (Beckman, 1987). Entre los elicitores que desencadenan la respuesta activa se incluyen oligogalacturónidos liberados de las paredes celulares del huésped, por la acción de enzimas pécticas secretadas por el patógeno. Durante los primeros momentos de la infección, enzimas "endo" activas sobre las pectinas actúan sobre la pared celular de las células huésped y solubilizan oligourónidos que pueden actuar como señales para iniciar los mecanismos de defensa. Así, oligómeros de homogalacturonano con un grado de polimerización entre 10 y 13, liberados de las paredes celulares de *Ricinus* por la acción de una poligalacturonasa del hongo *Rhizopus stolonifer* tienen actividad como elicitores de la síntesis de fitoalexinas (West y col., 1985). También fragmentos de homogalacturonano con un resto de ácido 4,5 anhidrogalacturónico insaturado en el extremo no reductor, liberados de paredes celulares de soja por la acción de una pectato liasa de la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora*, son activos como elicitores de fitoalexinas (Colmer and Keen, 1986). Por otra parte, la actividad del factor inductor de inhibidores de proteasas (PIIF) en plantas de tomate, alfalfa y patata, reside en pequeñas cadenas de ácido galacturónico enlazadas en  $\alpha(1-4)$ , con un grado de polimerización de 2-6 (Ryan y col., 1985). Recientemente se ha demostrado que

la interacción entre poligalacturonasa y una proteína inhibidora de la poligalacturonasa, en el reconocimiento planta-patógeno, favorece la formación de oligogalacturonidos capaces de elicitar mecanismos de defensa (Cervone y col., 1996).

La presencia de complejos multienzimáticos y su regulación puede ser importante para conferir una mayor capacidad pectolítica al microorganismo productor. Así, en diversos estudios realizados en los que se interumpía el gen específico de algunas de las enzimas que intervienen en la patogénesis, como cutinasas y poligalacturonasas entre otras, se veía que el microorganismo no disminuía su capacidad patogénica debido a la existencia de múltiples formas enzimáticas codificadas por diferentes genes (Oliver y Osbourn, 1995). No obstante, en las interacciones huésped-patógeno, las distintas enzimas pueden cumplir distintas funciones y contribuir en distinto grado a la capacidad de macerar, a la inducción del complejo enzimático o al fenómeno de reconocimiento. Por tanto, el conocimiento exhaustivo de las distintas enzimas presentes en un organismo y sus propiedades particulares puede ser muy importante para conocer sus mecanismos de patogénesis.

#### **3.4.- Degradación de las paredes celulares de tomate por *Fusarium oxysporum*.**

En las interacciones de *Fusarium oxysporum* con sus huéspedes en general, y con tomate en particular, la relación huésped-parásito parece estar muy lejos de ser la interacción extremadamente evolucionada que los biótrosos mantienen con sus huéspedes, a pesar de la alta especificidad existente. Las respuestas básicas observadas en las plantas de tomate parecen ser similares en las interacciones del hongo con cultivares susceptibles y resistentes, y son también desencadenadas por muchos organismos no patógenos para tomate. Entonces, en una interacción entre un cultivar de tomate susceptible y *Fusarium*, el reconocimiento parece ocurrir normalmente y la diferencia entre una resistencia efectiva o la susceptibilidad

depende de diferencias cuantitativas en el fenómeno de reconocimiento y en la velocidad y extensión de la respuesta del huésped (Beckman, 1987).

Las modificaciones de las paredes celulares que provoca FORL durante la colonización de la corteza radicular y estela de plantas de tomate sugieren la presencia de polisacaridasas activas sobre la lámina media y las paredes primaria y secundaria. Tales efectos son típicos de la acción de polisacaridasas pécticas y celulolíticas, pero según un modelo de infección distinto al de FOL, cuyo avance a través de los tejidos infectados es fundamentalmente intercelular y mucho menos agresivo que el de FORL (Bishop y Cooper 1983a; Brammall y Higgins, 1988a). La detección citoquímicamente de ácido galacturónico en los tejidos infectados por FORL en la proximidad al patógeno (Benhamou y col., 1990a; Chamberland y col., 1989), corrobora la acción de enzimas pectolíticas sobre la pared celular durante la entrada del hongo. En la mayoría de los casos, las áreas de pared del huésped, adyacentes a los canales de penetración de FORL, no muestran signos de alteración de pectina lo que indica que la acción de las enzimas pécticas sobre la pared es localizada (Benhamou y col., 1990a).

La dificultad de los cultivos *in planta* y la posibilidad de cultivar estos hongos *in vitro* hace que la mayoría de los datos sobre las enzimas pécticas se hayan obtenido de cultivos *in vitro* sobre diferentes fuentes carbonadas similares más o menos a los sustratos *in planta*

Ambas formas especiales, FOL y FORL, producen enzimas pécticas, entre otras polisacaridasas, cuando son cultivadas en medio líquido sobre distintas fuentes de carbono. Cooper y Wood (1973) demostraron la producción de poligalacturonasa, pectín-liasa, celulasa y arabinanasa por FOL cultivado, en medio líquido, sobre paredes celulares aisladas de tomate. También estudiaron la regulación de la síntesis de estas polisacaridasas, comparando los niveles de actividad en cultivos sobre paredes celulares aisladas, sobre ácido galacturónico u otros azúcares (Cooper y Wood, 1975). Blais y colaboradores (1992) han demostrado la producción de enzimas pécticas por FORL cultivado sobre pectina

o pared celular aislada de tomate. Las condiciones óptimas de producción de enzimas pécticas para varios aislamientos de FOL, razas 1 y 2, y de FORL han sido establecidas y, aunque todos ellos disponen de un sistema complejo de poligalacturonasas, se han podido detectar diferencias cuantitativas en los niveles de actividad entre los distintos aislamientos (Fernández y col., 1993), siendo FOL raza 1 el organismo que acumula mayores niveles de actividad. Actualmente se han purificado una exopoligalacturonasa mayoritaria de FORL r6 (Vázquez y col., 1993) y una endopoligalacturonasa, una exopoligalacturonasa y una pectato liasa de FOL (Di Prieto y Roncero, 1996a, 1996b, 1996c).

Sin embargo, la implicación de estas enzimas en la expresión de los síntomas en plantas de tomate infectadas no ha sido demostrada. La producción de polisacaridasas por FORL en un sistema *in vitro* no refleja necesariamente la situación en la planta infectada, donde muchos de los factores inherentes a la interacción huésped-patógeno pueden modificar el modelo de producción de estas enzimas. Para poder afirmar que están implicadas en el desarrollo de la enfermedad, es preciso demostrar su presencia en plantas infectadas cuando se está manifestando la sintomatología y donde se está produciendo degradación de paredes celulares (Cooper, 1983).

Aun cuando puedan existir diferencias entre el cultivo *in vitro* y la planta infectada es necesario un conocimiento previo de las enzimas producidas en medios de cultivo para poder posteriormente comprobar si todas ellas están implicadas en el proceso de infección y si alguna nueva enzima es producida solamente *in vivo*. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de las enzimas pécticas producidas por FORL *in vitro*, determinando los factores que afectan tanto a la síntesis como a la actividad. Por último, se han elegido las liasas para su purificación y caracterización.

## CAPÍTULO 2.

Producción de Polisacaridasas por dos Aislamientos r2  
y r6 de FORL.



## INTRODUCCIÓN

Las bacterias y los hongos fitopatógenos producen un amplio rango de enzimas activas en la degradación de paredes celulares de plantas. Estas enzimas son importantes tanto para la penetración del patógeno y posterior invasión de los tejidos del huésped, como para la obtención de productos que utiliza para su crecimiento. Los hongos fitopatógenos *Verticilium albo-atrum* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* producen, en presencia de paredes celulares aisladas de tomate, un amplio rango de polisacaridasas extracelulares que van secretando de forma secuencial (Cooper y Wood, 1975). *Verticilium albo-atrum* produce en primer lugar endo-poligalacturonasa seguida de exo-arabinanasa, endo-pectín-*trans*-eliminasa, endo-xilanasa y celulasa, son también producidas  $\beta$ -galactosidasa, galactanasa y  $\beta$ -glucosidasa. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* produce endo-poligalacturonasa, endo-pectín-*trans*-eliminasa, arabinanasa,  $\beta$ -galactosidasa, xilanasa y celulasa. *Colletotrichum lindemuthianum* secreta en primer lugar pectinasa y  $\alpha$ -arabinosidasa, seguidas de  $\beta$ -xilosidasa y celulasa; a continuación  $\beta$ -glucosidasa y finalmente  $\alpha$ -galactosidasa (English y col., 1971). El orden en que son secretadas cuando se crece sobre paredes celulares puede reflejar el orden en que estas enzimas deben actuar para degradar la pared celular. La acción de las enzimas pécticas, las primeras en ser producidas, parece ser un requisito para la acción de otras enzimas, debido a la mayor accesibilidad de los polisacáridos pécticos en la pared celular (Collmer y Keen, 1986).

Los polisacáridos pécticos son el componente principal de la pared celular primaria y de la lámina media de dicotiledóneas además de los más accesible. Por tanto las enzimas pécticas parecen jugar un papel esencial en el ataque inicial a las paredes celulares de dicotiledóneas. Los hongos normalmente producen poligalacturonasas y/o pectín liasa y las bacterias pectato liasas. No obstante, algunos hongos como *Fusarium solani*, *Aspergillus nidulans* y *Amycolata*



producen pectato liasas (Brühlmann, 1995; Crawford y Kolattukudy, 1987; Dean y Timberlake, 1989) y algunas bacterias como *Pseudomonas* producen pectín liasas (Nikaidou y col., 1995; Schlemmer y col., 1987). En algunos casos, como en *Erwinia carotovora*, se ha descrito la producción de pectín y pectato liasa por el mismo organismo (Barras y col., 1994).

Las enzimas pécticas que un determinado hongo produce dependen del sustrato presente en el medio y/o de las condiciones de cultivo (Bateman, 1966). Sin embargo, también puede deberse a la variabilidad existente entre distintos aislamientos. Se ha visto considerable variabilidad isoenzimática dentro de cada forma especial (Carbonell y col., 1994; Elias y Schneider, 1992). Así, en aislamientos de FOL y FORL se han detectado diferencias de hasta 5 ó 6 veces en la producción de poligalacturonasa (Fernández y col., 1993). No obstante, Blais y colaboradores (1992), utilizando cuatro aislamientos de cada una de las formas especiales, FOL y FORL, no observaron diferencias significativas en la producción de poligalacturonasa y pectín liasa.

Para conocer la capacidad de FORL para secretar enzimas pécticas y otras polisacaridasas se ha estudiado la evolución de distintas actividades enzimáticas en los cultivos fúngicos. Se han utilizado dos aislamientos, r2 y r6, para detectar las diferencias entre ellos y se han valorado todas las posibles liasas o hidrolasas pécticas. También se ha estudiado la influencia de algunos factores como la concentración de cloruro cálcico, la fuente de carbono y el pH inicial de los medios de cultivo sobre la producción de enzimas pécticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo han sido utilizados los aislamientos r2 y r6 del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, proporcionados por el Dr. J. Tello (Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid). Fueron obtenidos a partir de cultivos monospóricos aislados a partir de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectadas.

Los aislamientos han sido mantenidos mediante resiembras periódicas en placas petri con agar sacarosa-patata (PSA) incubadas a 26 °C y posteriormente conservados a 4 °C. Los hongos han sido mantenidos a largo plazo como suspensiones de clamidosporas en tierra.

La capacidad de infectar plantas de tomate ha sido probada periódicamente según describe Sánchez y colaboradores (1975).

### CULTIVO DE HONGOS

#### Medios

El medio de cultivo utilizado contenía por ml: 4,6 mg de casaminoácidos, 1 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2  $\mu\text{g}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0  $\mu\text{g}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02  $\mu\text{g}$  de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02  $\mu\text{g}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0,02  $\mu\text{g}$  de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Las fuentes de carbono, suministradas al 0,5 % a los medios han sido: glucosa (Probus), ácido poligalacturónico (sal sódica) (Sigma) o pectina de manzana (Fluka).

Los medios fueron ajustados a pH 5,5 antes de la esterilización durante 15

min a 120 °C o a pH 8,0 después de la esterilización.

### **Inóculo y crecimiento del hongo**

Los matraces fueron inoculados con 1 ml de agua destilada estéril, que contenía  $1 \times 10^6$  conidios obtenidos a partir de las resiembras en placa petri. Para obtener esta suspensión se le añadió agua a una placa mantenida a 4 °C y se agitó ligeramente. La concentración de conidios fue determinada por recuento en una cámara de Neubauer (hemocitómetro). Los cultivos crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio salino y diferentes fuentes de carbono en cada caso. Fueron incubados a 22 °C en un agitador orbital (New Brunswick, EEUU) a 150 rpm.

FORL fue mantenido tres días en glucosa al 0,5 % y a continuación 1 ml de este cultivo fue transferido a matraces con medio salino fresco y diferentes fuentes de carbono, donde permaneció durante varios días.

Los cultivos fueron recogidos a diferentes tiempos. El crecimiento del hongo fue estimado con una cámara de Neubauer por recuento de esporas después de pasar por lana de vidrio. Los cultivos fueron clarificados por filtración a través de fibra de vidrio (Whatman GF/A) y, después de diálisis frente a agua destilada a 5 °C durante 16-18 h, fueron usados para la determinación de las actividades enzimáticas y proteínas.

## **ENSAYOS ENZIMÁTICOS**

### **Valoración de actividades pectín y pectato liasa.**

La medida de actividad pectín liasa y pectato liasa se realizó midiendo el incremento en absorbancia a 235 nm del producto 4,5-insaturado de la reacción

a 37 °C y 30 minutos de incubación. Las mezclas de reacción contenían 0,25 ml de extracto, 0,25 ml de agua destilada y 2,0 ml de pectina de manzana al 0,24 % o ácido poligalacturónico (sal sódica) al 0,1 % respectivamente, en tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) con CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Una unidad de actividad enzimática ha sido definida como la cantidad de enzima requerida para formar 1 μmol de producto 4,5-insaturado por minuto en las condiciones del ensayo. El coeficiente de extinción molar del producto insaturado de pectín liasa y pectato liasa es 5550 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y 4600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, respectivamente (Collmer y col., 1988).

Las actividades pectín liasa y pectato liasa también fueron valoradas midiendo el descenso en la viscosidad de las mezclas de reacción. Las medidas viscosimétricas fueron realizadas usando viscosímetros Cannon-Fenske a 37 °C y 30 minutos de incubación. Las mezclas de reacción contenían 3,0 ml de extracto y 3,0 ml de pectina de manzana o ácido poligalacturónico (sal sódica) al 1,5 % en tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) con CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Una unidad de actividad enzimática ha sido definida como la cantidad de enzima necesaria para cambiar la inversa de la actividad específica en 0,001 min<sup>-1</sup>, en las condiciones del ensayo. La viscosidad específica ( $n_{sp}$ ) es  $(t/t_0)-1$ , donde  $t$  es el tiempo de flujo (segundos) de la mezcla de reacción y  $t_0$  es el tiempo de flujo del tampón. La inversa de la actividad específica ( $n_{sp}^{-1}$ ) es proporcional al tiempo de incubación y a la cantidad de enzima usada (Goksoyr, 1988).

### **Valoración de actividad poligalacturonasa.**

La actividad poligalacturonasa fue valorada determinando la liberación de grupos reductores. Las mezclas de reacción, que contenían 0,5 ml de extracto enzimático y 0,5 ml de ácido poligalacturónico (sal sódica) al 0,5 % en tampón acetato 0,1 M, pH 5,0 y EDTA 0,005 M, fueron incubadas 30 minutos en agitación a 37°C, determinándose los azúcares reductores liberados por el método de Somogy y Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). La cuantificación se realizó

a partir de un banco de diluciones de glucosa. Una unidad de actividad enzimática ha sido definida como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de equivalente reductor por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Las medidas viscosimétricas para la poligalacturonasa fueron realizadas usando viscosímetros Cannon-Fenske a 37 °C. Las mezclas de reacción contenían 3,0 ml de extracto y 3,0 ml de ácido poligalacturónico (sal sódica) al 1,5 % en tampón acetato 0,1 M, pH 5,5, con EDTA 5 mM. La unidad de actividad enzimática viscosimétrica se definió igual que para las liasas.

#### **Valoración de actividades avicelasa y $\beta$ -1,4-glucanasa.**

Las actividades avicelasa y  $\beta$ -1,4-glucanasa fueron valoradas mediante la determinación de los azúcares reductores producidos en la reacción, por el método de Somogyi y Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Las mezclas de reacción contenían 0,5 ml de extracto enzimático y 0,5 ml de avicel o carboximetilcelulosa respectivamente al 0,5 % en tampón acetato 0,1 M, pH 5,0. Fueron incubadas en agitación a 37 °C durante 30 min. Las unidades de actividad enzimática han sido definidas como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de equivalente reductor por minuto bajo las condiciones del ensayo.

#### **Valoración de actividad $\beta$ -glucosidasa.**

La  $\beta$ -glucosidasa fue valorada utilizando como sustrato p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido. La mezcla de reacción contenía 0,2 ml de extracto y 1,8 ml de sustrato al 0,05 % en tampón acetato 0,1 M, pH 4,0. Después de la incubación a 37 °C durante 60 min, la reacción fue parada con 1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N y EDTA 2 mM y se midió la absorbancia a 400 nm. Las unidades de actividad enzimática han sido definidas como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

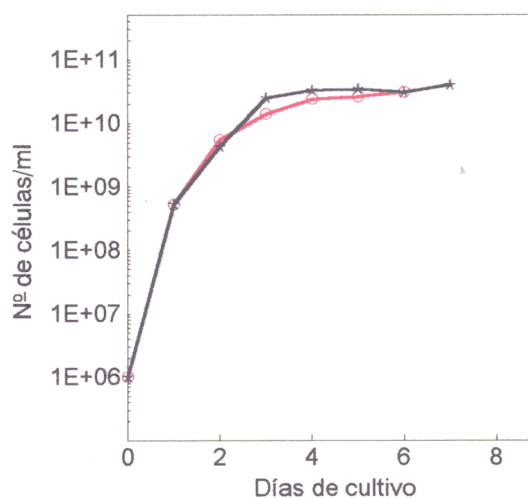
### **Determinación de proteínas.**

Las proteínas presentes en los filtrados fúngicos fueron determinadas por el método de Lowry (Lowry, 1951) usando seroalbúmina bovina (Sigma) como patrón.

## RESULTADOS

### CRECIMIENTO EN GLUCOSA

Los dos aislamientos, r2 y r6, alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento al tercer día de cultivo en glucosa, manteniéndose estable el número de células hasta el séptimo día (figura 2.1). Por tanto, todos los cultivos utilizados en este trabajo fueron estandarizados mediante el cultivo inicial de tres días en glucosa.



**Figura 2.1.** Curvas de crecimiento de cultivos de FORL, aislamiento r2 (-x-) y r6 (-o-), sobre glucosa al 0,5 %.

### PRODUCCIÓN DE POLISACARIDASAS

Se ha estudiado el crecimiento y la producción de pectín liasa, poligalacturonasa, avicelasa,  $\beta$ -1,4-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa en cultivos de los aislamientos r2 y r6 crecidos durante trece días sobre pectina, a pH inicial 5,5 (figura 2.2).

**Figura 2.2.** Curva de crecimiento y evolución de actividades pectín liasa, poligalacturonasa, avicelasa,  $\beta$ -1,4-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa en cultivos de FORL, aislamiento r2 (-x-) y r6 (-o-), sobre pectina como fuente de carbono. Previamente el hongo fue mantenido tres días en glucosa al 0,5 % y a continuación 1 ml de este cultivo fue transferido a un matraz nuevo con pectina.

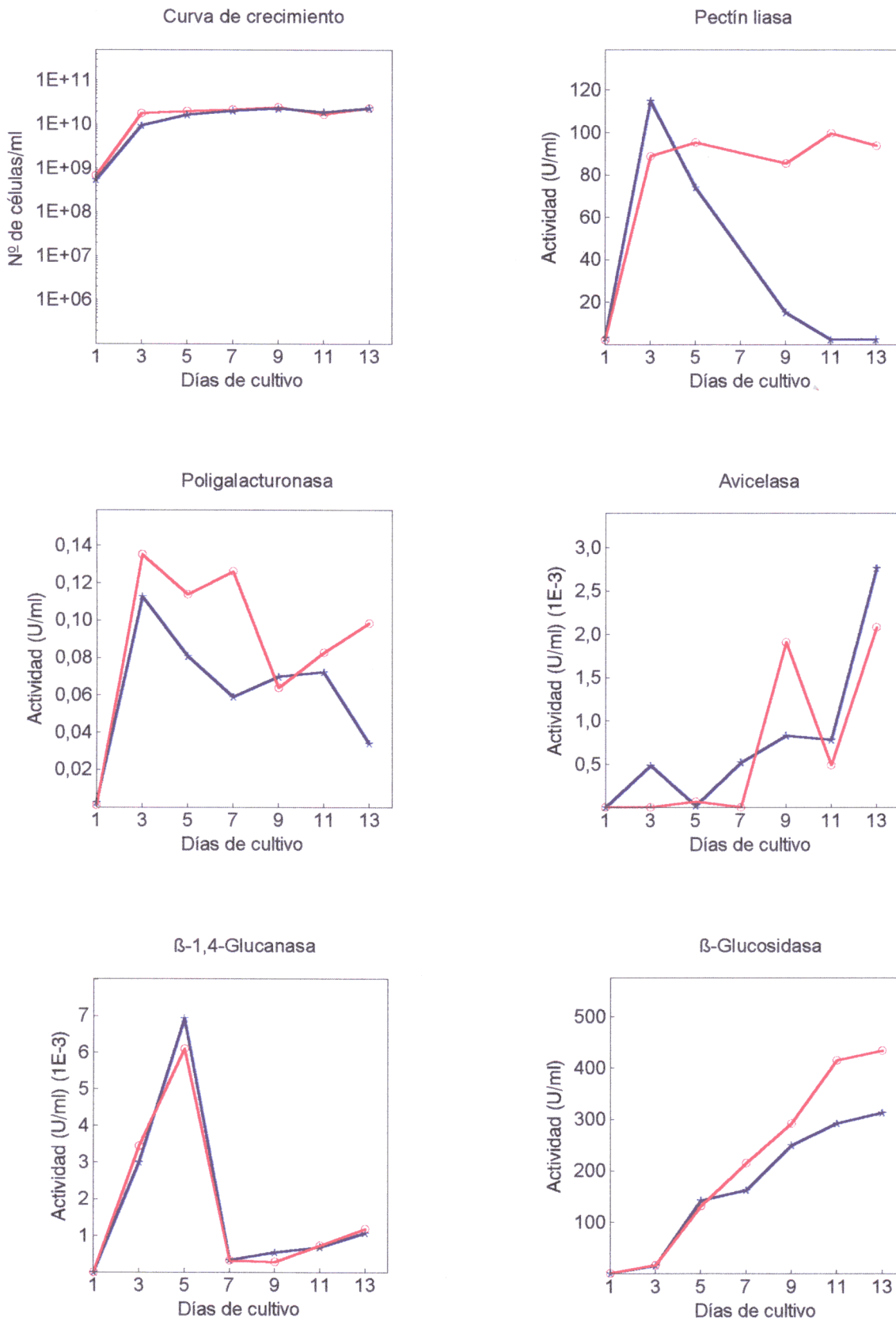


Figura 2.2.





Las curvas de crecimiento obtenidas para los dos aislamientos fueron prácticamente idénticas (figura 2.2). La fase estacionaria se alcanzó a los tres días de cultivo en glucosa y el número de células se mantuvo durante los trece días de cultivo en pectina.

En la figura 2.2 se muestra la evolución de la pectín liasa valorada por viscosimetría. Los dos aislamientos produjeron pectín liasa durante el cultivo en pectina. En el aislamiento r2 la actividad alcanzó un máximo al tercer día y luego descendió, mientras que en r6 los niveles de actividad detectados al tercer día en pectina se mantuvieron a similares niveles durante los trece días de cultivo.

La producción de poligalacturonasa, valorada mediante determinación de los azúcares reductores producidos, fue también máxima al tercer día de cultivo en pectina, pero mientras que en los cultivos de r2 la actividad descendió en los días sucesivos, en los de r6 se mantuvo hasta el séptimo día (figura 2.2).

Los niveles de actividad avicelasa detectados en los cultivos de ambos aislamientos sobre pectina fueron bajos durante los primeros días para aumentar en la segunda fase del período de experimentación, sin que en el decimotercer día se pudiera contabilizar el nivel máximo (figura 2.2).

La producción de  $\beta$ -1,4-glucanasa aumentó durante los primeros días de cultivo sobre pectina para alcanzar el máximo al quinto día en ambos aislamientos (figura 2.2). Después se mantuvo en niveles muy inferiores.

La actividad  $\beta$ -glucosidasa fue detectable en los dos aislamientos al tercer día de cultivo en pectina y fue aumentando paulatinamente hasta el decimotercer día (figura 2.2). Los valores de actividad para r6 fueron ligeramente superiores a los de r2.

## CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS

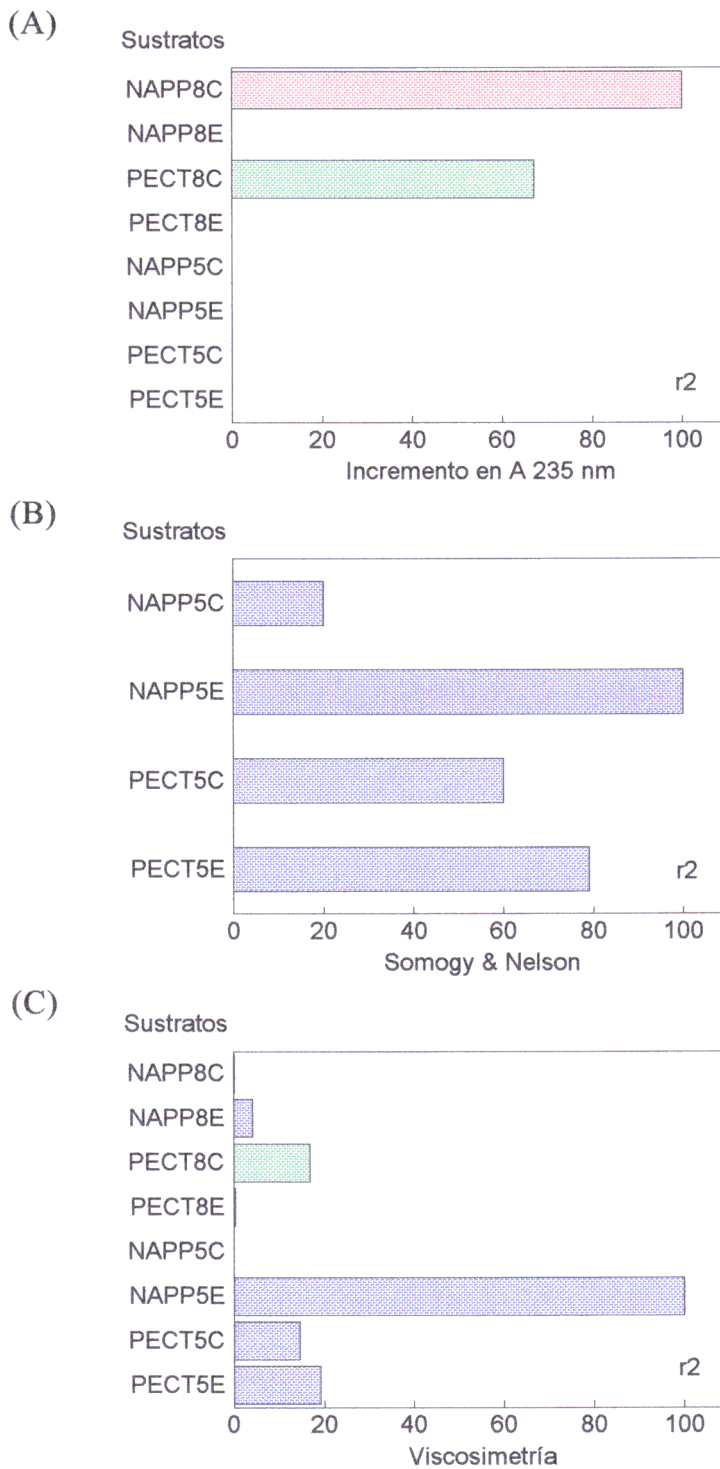
Una vez determinadas las condiciones de crecimiento y de producción de enzimas pécticas por los dos aislamientos, se procedió a determinar qué actividades pécticas predominan o están presentes en los cultivos crecidos durante tres días en pectina a pH inicial 5,5, tiempo en el que se habían detectado los máximos de actividad para la pectín liasa y para la poligalacturonas.

Para ello se ha valorado :

- incremento en absorbancia a 235 nm de mezclas de reacción en presencia de pectato o de pectina; se mide la formación de los productos 4,5-insaturados de la acción de pectato o pectín liasa; por lo tanto es un método exclusivo de liasas,
- producción de azúcares reductores en mezclas de reacción en presencia de pectina o de pectato; tanto hidrolasas como liasas que degraden sustratos pécticos liberan azúcares reductores.
- viscosimetría, se mide el descenso en viscosidad del sustrato, que es más acusado cuando se produce la ruptura de enlaces internos en la molécula del sustrato, tanto si es hidrólisis como si es ruptura lítica.

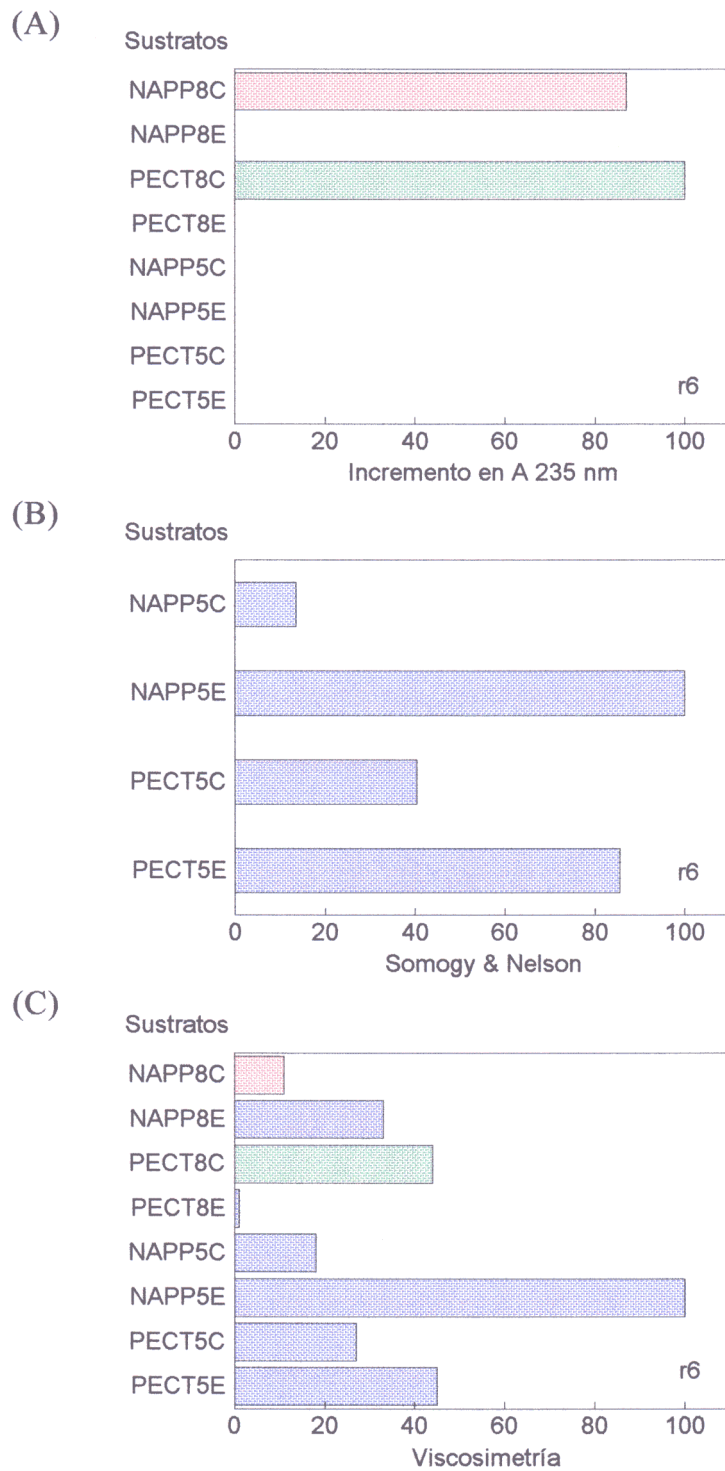
En todos los casos fueron valoradas todas las posibilidades: pectina o pectato, en mezclas de reacción a pH 5,0 u 8,0 y con  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  o con EDTA, excepto para la determinación de azúcares reductores, caso en el que se utilizó solo pH 5,0, ya que el método no es apropiado para pHs alcalinos. En las figuras 2.3 y 2.4 se representan todas las valoraciones.

Cuando se determinó el incremento en absorbancia a 235 nm, sólo hubo actividad a pH 8,0 y en presencia de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  (figuras 2.3A y 2.4A). En el aislamiento r2 la actividad con pectina fue menor, que con pectato; en pectina hay un 67 % de la obtenida con pectato. El aislamiento r6 presentó niveles similares de actividad con pectina y con pectato; en presencia de pectato la actividad



**Figura 2.3.** Actividades pécticas en cultivos de FORL r2. (A) incremento en absorbancia a 235 nm, (B) método de Somogy y Nelson y (C) viscosimetría. Se utilizaron mezclas de reacción a pH 8,0 ó pH 5,0, en presencia de pectato (NAPP) o pectina (PECT) y con CaCl<sub>2</sub> o EDTA. Los datos se expresan como porcentaje de la máxima actividad.





**Figura 2.4.** Actividades pécticas en cultivos de FORL r6. (A) incremento en absorbancia a 235 nm, (B) método de Somogy y Nelson y (C) viscosimetría. Se utilizaron mezclas de reacción a pH 8,0 ó pH 5,0, en presencia de pectato (NAPP) o pectina (PECT) y con  $\text{CaCl}_2$  o EDTA. Los datos se expresan como porcentaje de la máxima actividad.



representó el 87 % de la obtenida con pectina.

En los dos aislamientos la máxima actividad, valorada como producción de azúcares reductores a pH 5,0, se obtuvo en presencia de EDTA (sin calcio) en la mezcla de reacción (figuras 2.3B y 2.4B). El sustrato preferentemente utilizado fue pectato ya que con pectina la actividad descendió a un 79 % en r2 y a un 86 % en r6. La presencia de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  provocó un descenso en los niveles de actividad con ambos sustratos y en los dos aislamientos, siendo más afectada por calcio la degradación de pectato que la de pectina.

Las actividades pécticas valoradas por viscosimetría muestran la presencia de dos componentes. Uno, activo sobre pectina a pH 8,0, que es inhibido por la presencia de EDTA en la mezcla de reacción y otro, activo sobre pectato a pH 5,0, que es inhibido por calcio (figuras 2.3C y 2.4C).

## EFFECTO DEL CLORURO CÁLCICO EN EL MEDIO DE CULTIVO

La necesidad de calcio en las mezclas de reacción para las actividades liasas ha llevado al estudio del efecto del cloruro cálcico en los medios de cultivo de ambos aislamientos. Se han valorado actividades pectín liasa (PNL) y pectato liasa (PL) a pH 8,0, mediante incremento en absorbancia a 235 nm y viscosimetría, y poligalacturonasa (PG) a pH 5,0 determinando la liberación de azúcares reductores y la viscosimetría. Todas ellas han sido determinadas en filtrados fúngicos procedentes de cultivos de r2 y r6 durante tres días sobre pectina. Los cultivos fueron suplementados con cloruro cálcico hasta una concentración final de 0, 2, 5 ó 10 mM.

### **Crecimiento del hongo**

El crecimiento del aislamiento r2 fue inhibido por  $\text{CaCl}_2$  a concentraciones



de 2, 5 y 10 mM hasta un 45, 34 y 32 % respectivamente, en comparación con el crecimiento en ausencia de calcio (figura 2.5).

El aislamiento r6 presentó un comportamiento muy similar (figura 2.5); el crecimiento en presencia de  $\text{CaCl}_2$  2, 5 y 10 mM, representó el 80, 53 y 49 % del crecimiento en ausencia de calcio.

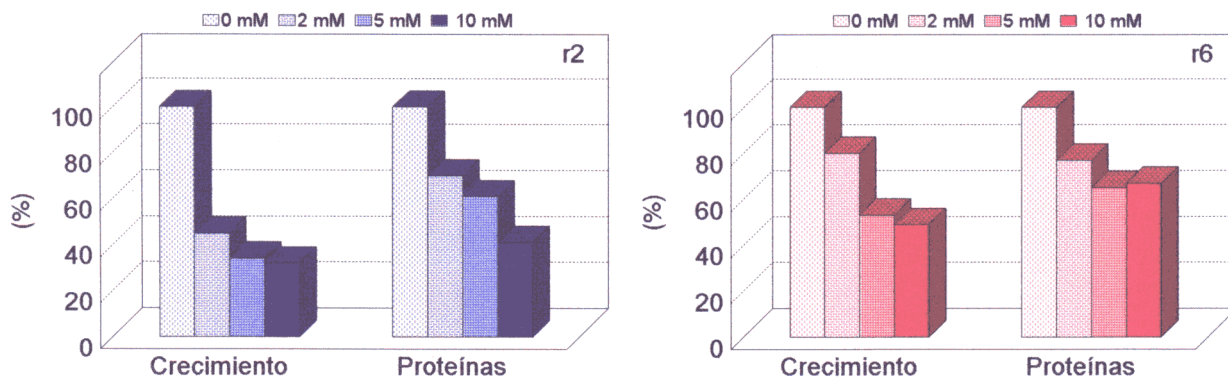
### **Concentración de proteínas en los filtrados fúngicos**

En ambos aislamientos descendió la cantidad de proteínas en los filtrados fúngicos en presencia de  $\text{CaCl}_2$ . A una concentración 10 mM pasó a representar el 41 %, en r2, y el 67 %, en r6, del cultivo en ausencia de  $\text{CaCl}_2$  (figura 2.5).

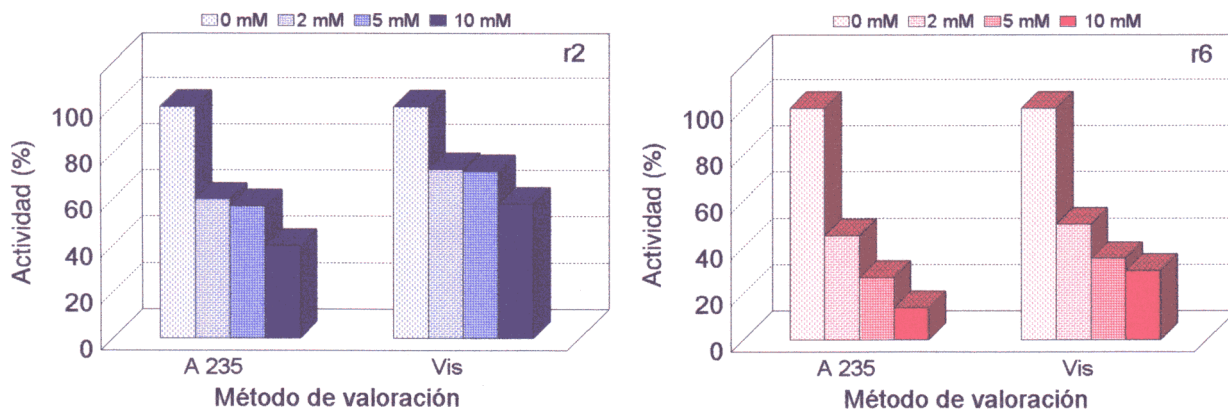
### **Producción de enzimas**

La pectín liasa, tanto valorada por incremento en absorbancia a 235 nm como por viscosimetría, descendió con el aumento de  $\text{CaCl}_2$  en el medio, en ambos aislamientos (figura 2.6). El descenso en actividad fue mayor en r6 que en r2. En r2 a una concentración de 10 mM se detectó una actividad del 40 y 58 % de la actividad en ausencia de  $\text{CaCl}_2$  según el método utilizado, incremento en absorbancia o viscosimetría, mientras que en r6 se detectó un 14 % por incremento en absorbancia y un 30 % por viscosimetría.

La pectato liasa se vio también afectada por la presencia de  $\text{CaCl}_2$ . Disminuyó la actividad con el aumento en concentración de  $\text{CaCl}_2$  en los dos aislamientos, aunque el efecto fue menor en r2 (figura 2.7). A una concentración de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  por incrementó se detectó un 34 %, en r2, y un 21 %, en r6, con respecto al cultivo en ausencia de calcio. Por viscosimetría no se detectó actividad en ningún caso.

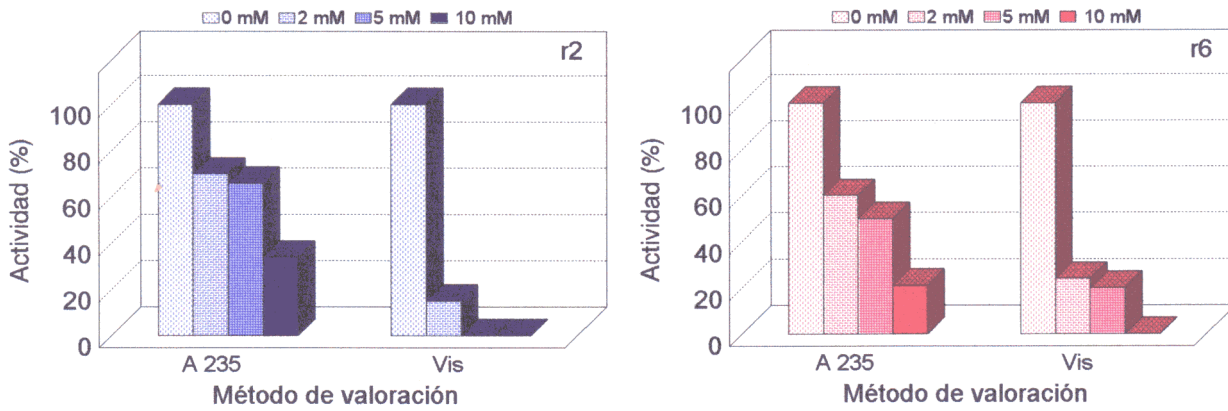


**Figura 2.5.** Proteínas y crecimiento en cultivos de r2 (azul) y r6 (rojo) crecidos durante tres días en pectina y con diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (0, 2, 5 y 10 mM). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100% los valores obtenidos en ausencia de CaCl<sub>2</sub>.

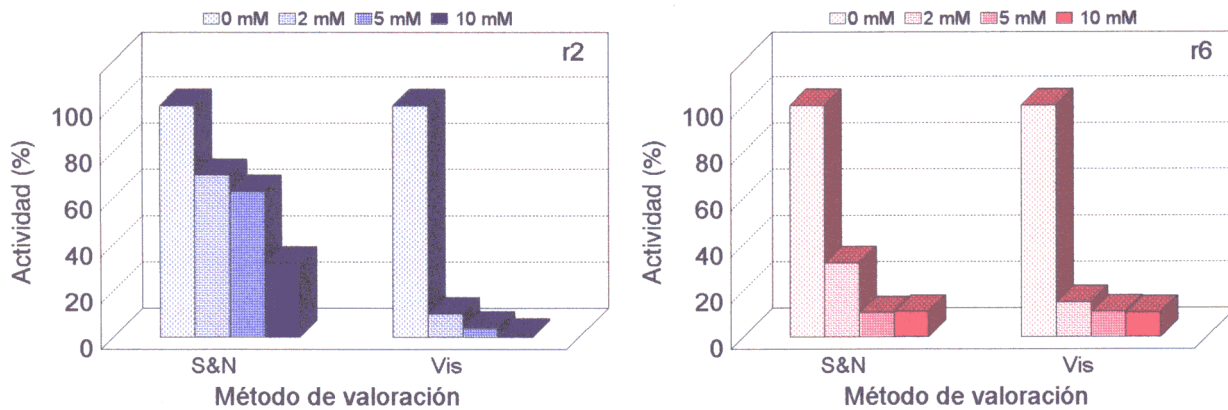


**Figura 2.6.** Actividad PNL en cultivos de r2 (azul) y r6 (rojo) crecidos durante tres días en pectina y con diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (0, 2, 5 y 10 mM). La actividad fue valorada por el método de incremento en A<sub>235nm</sub> (A 235) y por el descenso en viscosidad (Vis). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100% los valores obtenidos en ausencia de CaCl<sub>2</sub>.





**Figura 2.7.** Actividad PL en cultivos de r2 (azul) y r6 (rojo) crecidos durante tres días en pectina y con diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> en el medio (0, 2, 5 y 10 mM). La actividad fue valorada por el método de incremento en A<sub>235nm</sub> (A 235) y por el descenso en viscosidad (Vis). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100% los valores obtenidos en ausencia de CaCl<sub>2</sub>.



**Figura 2.8.** Actividad PG en cultivos de r2 (azul) y r6 (rojo) crecidos durante tres días en pectina y con diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (0, 2, 5 y 10 mM). La actividad fue valorada por el método de Somgy y Nelson (S&N) y por el descenso en viscosidad (Vis). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100% los valores obtenidos en ausencia de CaCl<sub>2</sub>.



La poligalacturonasa, valorada tanto como producción de azúcares reductores como por viscosimetría, presenta un comportamiento similar al obtenido para las dos liasas, en ambos aislamientos; el aumento de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo provocó un descenso en la producción de la enzima (figura 2.8). A una concentración de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  la actividad representó según el método utilizado un 32 y un 1 %, en r2, y un 11 y un 10 %, en r6, con respecto al cultivo en ausencia de calcio.

#### EFFECTO DEL pH Y DEL SUSTRATO PÉCTICO PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICAS

Se ha comparado la producción de pectín liasa, pectato liasa y poligalacturonasa al tercer día de crecimiento de los aislamientos r2 y r6, en cultivos sobre polipectato sódico o pectina. Los medios con polipectato sódico y pectina fueron ajustados a pH 5,5 ó pH 8,0.

##### **Efecto del sustrato péctico sobre el crecimiento del hongo**

El sustrato péctico añadido al medio de cultivo afectó al crecimiento de ambos aislamientos. En la figura 2.9 se pueden ver las diferencias. En el aislamiento r2 el crecimiento fue superior sobre pectina tanto a pH inicial 5,5 como a pH 8,0: en polipectato los valores descendieron al 45 y 51 % respectivamente del crecimiento observado en pectina a ambos valores de pH. En r6 la pectina fue también la fuente de carbono que proporcionó mejor crecimiento, a ambos valores de pH (figura 2.9). En polipectato sódico, a pH inicial 5,5 u 8,0, los niveles fueron muy similares entre si, 56 y 43 % respectivamente del crecimiento en pectina.

### **Efecto del sustrato péctico sobre la concentración de proteínas en los filtrados fúngicos**

Las proteínas también muestran diferencias en los distintos medios, siendo mayor la concentración en presencia de pectina (figura 2.9). Los niveles detectados en los cultivos sobre polipeptato son similares en ambos aislamientos: para r2 el 35 y 45 % y para r6 el 46 y 56 % de la concentración de proteínas presente en los cultivos en pectina, a pH inicial 5,5 y 8,0, respectivamente.

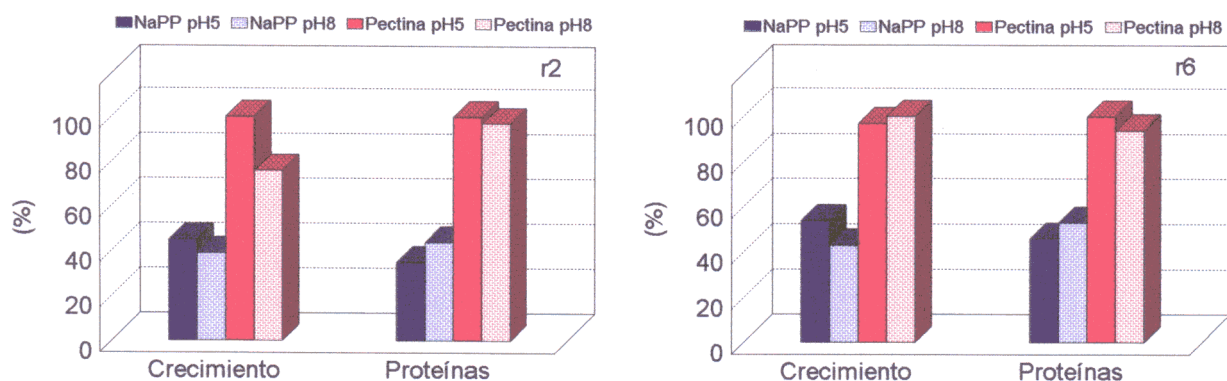
### **Variación del pH del medio de cultivo**

Los medios con pH inicial 5,5 se alcalinizaron, aumentando hasta valores próximos a 8,0, mientras que los ajustados a pH inicial 8,0 subieron sólo ligeramente, durante los tres días de cultivo.

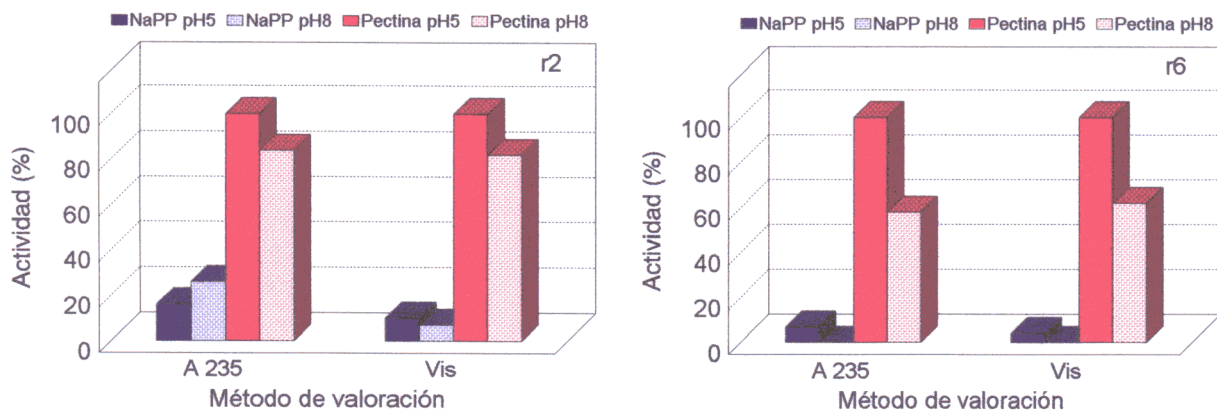
### **Efecto del sustrato péctico sobre la producción de enzimas pécticas**

Ambas liasas, PNL y PL, han sido valoradas por viscosimetría y por incremento en absorbancia a 235 nm (figuras 2.10 y 2.11). La PG ha sido valorada determinando el incremento en azúcares reductores y por viscosimetría (figura 2.12).

La producción de PNL fue mayor en los medios con pectina, a ambos valores de pH del medio, en los dos aislamientos (figura 2.10). En los cultivos de r2 con polipeptato a pH inicial 5,5, la actividad detectada representó el 16 y el 10 % de la presente en cultivos con pectina, dependiendo del método de valoración utilizado, incremento en absorbancia a 235 nm o viscosimetría, respectivamente. A pH 8,0 representó el 31 y el 9 %, respectivamente. En los cultivos de r6 a pH inicial 5,5, la producción de PNL sobre polipeptato también disminuyó, habiéndose obtenido unos valores del 7 y del 4 %, según el método de valoración



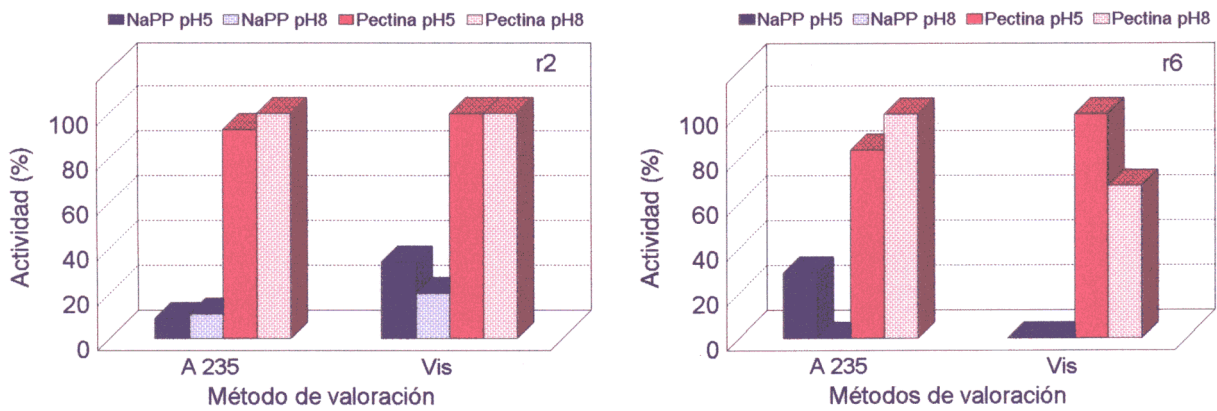
**Figura 2.9.** Proteínas y crecimiento en cultivos de r2 y r6 crecidos durante tres días en pectato (azul) o pectina (rojo) a pH 5,5 u 8,0. Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100 % los valores máximos obtenidos.



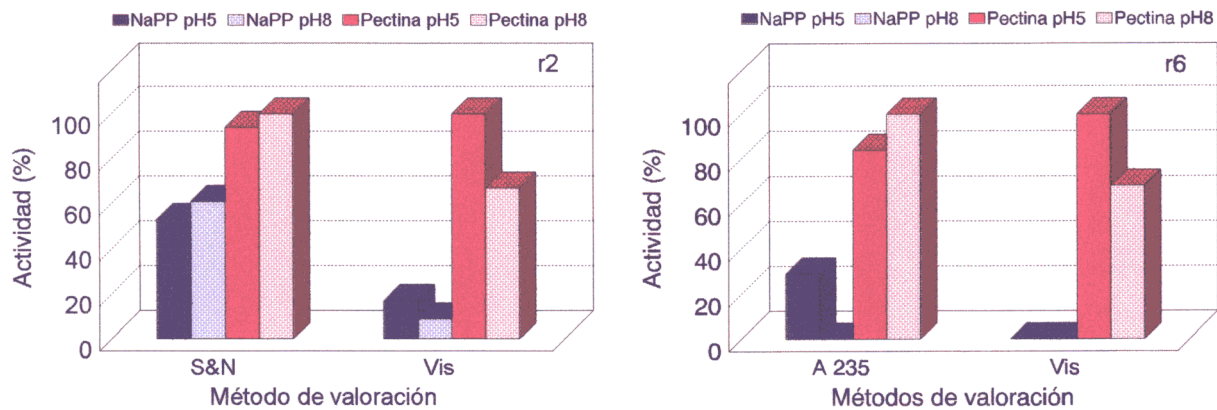
**Figura 2.10.** Actividad PNL en cultivos de r2 y r6 crecidos durante tres días en pectato (azul) o pectina (rojo) a pH 5,5 u 8,0. La actividad fue valorada por el método de incremento en  $A_{235nm}$  (A 235) y por el descenso en viscosidad (Vis). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100 % los valores máximos obtenidos.







**Figura 2.11.** Actividad PL en cultivos de r2 y r6 crecidos durante tres días en pectato (azul) o pectina (rojo) a pH 5,5 u 8,0. La actividad fue valorada por el método de incremento en  $A_{235nm}$  (A 235) y por el descenso en viscosidad (Vis). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100 % los valores máximos obtenidos.



**Figura 2.12.** Actividad PG en cultivos de r2 y r6 crecidos durante tres días en pectato (azul) o pectina (rojo) a pH 5,5 u 8,0. La actividad fue valorada por el método de Somogy y Nelson (S&N) y por el descenso en viscosidad (Vis). Los datos aparecen en porcentajes tomando como 100 % los valores máximos obtenidos.



utilizado, con respecto al cultivo en pectina. A pH 8,0 sobre polipectato no se detectó actividad.

La PL mostró el mismo comportamiento que la PNL. La pectina fue el mejor sustrato para su producción a ambos pHs en los dos aislamientos (figura 2.11). En extractos procedentes de cultivos de r2 en polipectato a pH inicial 5,5 se detectó el 10 % de actividad por incremento en absorbancia y el 34 % por viscosimetría con respecto al cultivo en pectina. A pH 8,0 la actividad también fue inferior sobre polipectato, se detectó el 10 y el 20 %, según el método utilizado, con respecto al cultivo en pectina. En los extractos de r6 en polipectato a pH inicial 5,5 no hubo actividad por viscosimetría y por incremento en absorbancia el 34 % con respecto al cultivo en pectina. A pH 8,0 no hubo actividad sobre polipectato.

La producción de PG fue también mayor sobre pectina, a ambos valores de pH (figura 2.12). En los cultivos de r2 en polipectato a pH inicial 5,5, la actividad detectada representó el 56 % por azúcares reductores y el 17 % por viscosimetría, respecto al cultivo en pectina. A pH 8,0 la actividad también fue inferior, habiéndose detectado valores alrededor del 61 % por azúcares reductores y del 13 % por viscosimetría. En r6, en pectato, a ambos pHs, los niveles fueron muy bajos o nulos.

### **Efecto del pH**

El pH inicial del medio de cultivo no modificó significativamente ni el crecimiento ni la concentración de proteínas en los filtrados fúngicos, en ambos aislamientos cultivados sobre ambos sustratos, pectina y pectato (figura 2.9).

Los niveles de las tres actividades enzimáticas valoradas, PNL, PL y PG cambiaron ligeramente en respuesta al pH inicial del medio, pudiéndose observar una ligera tendencia hacia el descenso de producción de enzimas pécticas a pH inicial 8,0 (figuras 2.10, 2.11 y 2.12).

## DISCUSIÓN

Los dos aislamientos de FORL estudiados, r2 y r6, produjeron, cuando fueron cultivados sobre pectina como fuente de carbono, diversas enzimas degradadoras de pared. Las primeras en aparecer fueron poligalacturonasa y pectín liasa, seguidas de  $\beta$ -1,4-glucanasa, avicelasa y  $\beta$ -glucosidasa (figura 2.2).

El orden de aparición de las distintas polisacaridasas es similar al observado en otros organismos como *Verticilium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) y *Colletotrichum lindemuthianum*, cultivados sobre paredes celulares aisladas de sus huéspedes (Cooper y Wood, 1975; English y col., 1971). Aunque en el caso de FORL no han sido utilizadas paredes celulares aisladas de tomate, se ha puesto de manifiesto la capacidad que tienen estos aislamientos para producir enzimas pécticas y celulasas, cuando son cultivados sobre pectina, y la secuencia de aparición en estas condiciones.

Durante los trece días de cultivo de los hongos sobre pectina, las dos actividades pécticas valoradas, pectín liasa y poligalacturonasa, mostraron un máximo de producción al tercer día de cultivo (figura 2.2). Por esto han sido utilizados cultivos de tres días sobre pectina para caracterizar inicialmente el tipo de actividades pécticas producidas por los dos aislamientos de FORL.

De los resultados obtenidos al determinar la formación de productos 4,5-insaturados, exclusivos de la acción de liasas, se puede concluir que FORL, r2 y r6, produce una o varias liasas, activas sobre pectato y sobre pectina y que requieren medio alcalino y la presencia de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  en la mezcla de reacción para ser activas, ya que en ausencia de calcio o a pH 5,0 no se detectó actividad (figuras 2.3A y 2.4A ).

Como las liasas de FORL, r2 y r6, no son activas a pH 5,0 en las mezclas de reacción, se puede considerar que los azúcares reductores producidos a pH 5,0 son productos saturados de la degradación hidrolítica de los sustratos pécticos. En

las figuras 2.3B y 2.4B se pone de manifiesto la presencia de una o varias poligalacturonasas en los cultivos de tres días sobre pectina. Estas enzimas son capaces de actuar sobre ambos sustratos, pectato y pectina, aunque se aprecia preferencia hacia pectato, y son inhibidas por calcio.

El descenso en viscosidad de sustratos pécticos puede ser producido por ambos tipos de enzimas pécticas, hidrolasas o liasas. A pH 8,0 y en presencia de calcio en las mezclas de reacción, condiciones en las que son activas las liasas, la actividad viscosimétrica detectada muestra preferencia hacia pectina (figuras 2.3C y 2.4C); con pectato la actividad es muy baja en r6 o prácticamente nula en r2. Teniendo también en cuenta los resultados obtenidos al determinar la formación de productos 4,5-insaturados se puede suponer la presencia de, al menos, dos liasas una activa preferentemente sobre pectato, que tendría un mecanismo de acción predominantemente "exo", y otra, con preferencia por pectina, con acción de tipo "endo". El descenso en viscosidad detectado en las mezclas de reacción a pH 5,0 revela la existencia de una o varias poligalacturonasas activas preferentemente sobre pectato e inhibidas por calcio (figuras 2.3C y 2.4C), en un comportamiento similar al observado en la determinación de azúcares reductores (figura 2.3B y 2.4B). La actividad viscosimétrica obtenida a pH 8,0 en ausencia de calcio (figura 2.3C y 2.4C), debe ser atribuida a las hidrolasas ya que no hay producción de dímeros insaturados en presencia de EDTA (figura 2.3A y 2.4A) y, al igual que la actividad poligalacturonasa valorada como producción de azúcares reductores, muestra preferencia de sustrato hacia pectato frente a pectina en ambos aislamientos. Se puede deducir también que las poligalacturonasas de FORL, r2 y r6, poseen un pH óptimo ácido, aunque son algo activas a pH 8,0. El hecho de que las poligalacturonasas actúen también a pH 8,0 y provoquen una reducción en la viscosidad de los sustratos pécticos, significa que podrían interferir en las medidas viscosimétricas de las endoliasas. Sin embargo, esta interferencia sería mínima ya que a pH 8,0 la actividad viscosimétrica de las poligalacturonasas es mucho mas

baja que a pH 5,0 y que la presencia de calcio en la mezcla de reacción disminuye considerablemente la actividad, incluso a pH 5,0.

El hecho de que las hidrolasas, en ausencia de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  sean más activas sobre pectato y en presencia de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  sean más activas sobre pectina, podría explicarse teniendo en cuenta que las uniones del calcio a los ácidos carboxílicos del ácido galacturónico podrían modificar la estructura del polímero, haciéndolo menos accesible a la poligalacturonasa. En el caso de la pectina estos grupos carboxílicos están metilados, por lo que la unión del calcio está limitada.

Por tanto, FORL cultivado sobre pectina produce pectín y pectato liasa y poligalacturonasa, éstas presentan las características típicas de estos tipos de enzimas (Cooper y col., 1978). Las liasas tienen requerimiento del ión calcio y pH óptimo alcalino y las poligalacturonasas son más activas a pH ácido y son inhibidas por calcio.

Una vez conocidas las actividades pécticas que predominan en los cultivos de ambos aislamientos sobre pectina, se ha procedido a estudiar los diversos factores que, se sabe, pueden influir en la síntesis: presencia de calcio, pH y fuente de carbono en el medio.

La adición de  $\text{CaCl}_2$  al medio provoca una disminución del crecimiento, de las proteínas totales y de la producción de las enzimas pécticas estudiadas, en los dos aislamientos. No obstante, parece que hay un efecto inhibitorio específico sobre las enzimas pécticas, ya que disminuyen más que las proteínas totales. La producción de PL por algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* sobre pectina requiere la presencia de calcio en el medio de cultivo para el proceso de inducción, mientras que en otras cepas no inducibles por pectinas, el calcio actúa como factor ambiental regulando la síntesis y/o exportación de PL (Liao y col., 1993).

El tipo de enzimas pécticas producidas por un determinado hongo depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo (Bateman, 1966). Los dos aislamientos de FORL producen mayores niveles de enzimas pécticas cuando son

crecidos sobre pectina que sobre pectato. Esto está de acuerdo con el comportamiento de varios aislamientos de FORL (Patiño y col., 1996) en los que la pectina es mejor sustrato que el pectato para la producción de poligalacturonasa.

En los medios de cultivo de FORL, r2 y r6, en presencia de pectato, además del descenso en los niveles de actividades pécticas, se produjo menor crecimiento y menor cantidad de proteínas que en presencia de pectina. Esto indica que la utilización de pectato por el hongo es menos eficiente que la utilización de pectina, posiblemente porque las enzimas pécticas de FORL, encargadas de la movilización de la fuente de carbono, son más efectivas en la degradación de pectina o bien que la pectina es mejor inductor de las enzimas pécticas de FORL que el pectato.

Algunos autores han demostrado que la producción de liasas por algunos hongos es mayor en medios alcalinos, mientras que la producción de poligalacturonasas es mayor a pH ácido (Blais y col., 1992; Bateman y Bashman, 1976). Sin embargo, el comportamiento de FORL r2 y r6 no se ajusta a este modelo; en los medios ajustados a pH inicial 8,0, los niveles de liasas son generalmente menores que en los medios ajustados a pH 5,5 (figuras 2.10 y 2.11). No obstante hay que tener en cuenta que en el momento de medir las actividades enzimáticas, el pH del medio era muy similar en ambos casos por la alcalinización que sufren los medios ajustados inicialmente a pH 5,5.

Teniendo en cuenta los datos anteriormente descritos se puede concluir que las condiciones óptimas para la producción de enzimas pécticas por FORL, r2 y r6, incluyen medios sobre pectina y sin calcio. El comportamiento de ambos aislamientos es semejante tanto en relación a las condiciones óptimas para la producción de las enzimas pécticas como respecto al tipo de enzimas producidas.





### CAPÍTULO 3.

Regulación de Liasas Pécticas y Poligalacturonasas por  
Ácido Galacturónico: Múltiples Formas.



## INTRODUCCIÓN

El tipo y la cantidad de enzimas pécticas producidas por un determinado hongo depende en gran medida del pH y de la fuente de carbono presentes en su entorno (Bateman, 1966). Las polisacaridasas producidas por la mayor parte de los microorganismos fitopatógenos parecen estar sujetas a represión catabólica (Biehn y Dimond, 1971a, b). Algunas polisacaridasas son producidas de forma constitutiva aunque son consideradas inducibles si su producción se ve aumentada en presencia del sustrato. En general, cada polisacaridasa suele ser inducida por el sustrato sobre el que actúa; pero, como el alto peso molecular de las moléculas de los polisacáridos impide la libre difusión de las mismas al interior del organismo, se considera que el auténtico inductor debe ser un monómero o dímero que es liberado a partir del polímero mediante la actividad de una polisacaridasa producida a niveles basales por el organismo: xilanasa por D-xilosa, endopoligalacturonasa y endopectín-liasa por ácido D-galacturónico, etc. Excepcionalmente la celulasa es inducida por celobiosa y la  $\beta$ -galactosidasa y galactanasa por L-arabinosa (Cooper y Wood, 1973, 1975). En algunos casos, sin embargo, el aumento en síntesis de una enzima en respuesta a la presencia de su sustrato no es una inducción sino la salida de represión catabólica: depende de la ausencia de niveles altos de una fuente de carbono fácilmente metabolizable y no de la presencia del sustrato específico (Bateman, 1976).

No obstante, la inducción de polisacaridasas específicas es un fenómeno real en algunos patógenos. La producción de endo-poligalacturonasa y de endo-pectinliasa (PNL) por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* es específicamente inducida por ácido galacturónico cuando es aportado a los cultivos de forma restrictiva para evitar su acumulación (Cooper y Wood, 1973, 1975). Ambas enzimas son también producidas por FORL aunque hay diferencias entre FOL y FORL (Blais y col., 1992): cuando varios aislamientos de ambas formas

especiales fueron cultivados sobre medios con pectina o fragmentos de pared celular de tomate como fuente de carbono, todos produjeron ambas enzimas; en cultivos sobre ácido galacturónico, FOL produjo ambas enzimas, mientras que FORL produjo principalmente poligalacturonasa y solo muy bajos niveles de pectín liasa; en presencia de glucosa o sacarosa fueron detectados bajos niveles de poligalacturonasa, mientras que pectín liasa no fue detectada en estas condiciones. En los experimentos de Blais y colaboradores (1992) la producción de poligalacturonasa fue generalmente superior en FORL que en FOL mientras que los aislamientos de FOL produjeron más pectín liasa que los de FORL. Fernández y colaboradores (1993) en cultivos estáticos sobre pectina detectaron mayor cantidad de poligalacturonasa en FORL y no detectaron pectín liasa.

Cada actividad enzimática puede estar producida por varias isoformas. Su número y pI puede variar no sólo entre aislamientos sino también según las condiciones del ensayo. El patrón de bandas de actividad poligalacturonasa ha sido obtenido mediante isoelectroenfoque para seis aislamientos de *Fusarium oxysporum*, dos de FOL raza 1, dos de FOL raza 2 y dos de FORL, crecidos en cultivos estáticos sobre pectina: cinco de los seis aislamientos coincidieron en presentar cuatro bandas con pIs 7,0, 6,5, 6,15 y 5,9; en el otro, una cepa de FORL, se detectaron tres bandas con pIs 7,45, 7,0 y 6,5 (Fernández y col., 1993). FOL cultivado en distintas condiciones muestra patrones diferentes para la poligalacturonasa, en presencia de pectina la isoforma mayoritaria tiene pI 7,0, en cultivos sobre ácido poligalacturónico hay una mayor inducción de las formas más ácidas (pIs 4,3 a 6,0) (Di Prieto y Roncero, 1996a). En el caso de las liasas, en FORL, no han sido descritas isoformas y, en FOL, sólo una de pI 8,7 ha sido descrita cuando se cultiva sobre ácido poligalacturónico o sobre tejidos vasculares de tomate (Di Prieto y Roncero, 1996b).

El tipo de enzima péctica producida por los hongos fitopatógenos parece depender del pH del entorno en el que el patógeno crece: el pH afecta marcadamente a la estabilidad de las enzimas producidas y también parece influir

en la producción de las liasas (Bateman y Bashman, 1976). Generalmente, a pHs ácidos se producen mayores niveles de poligalacturonasas (cuyo pH óptimo de actividad suele ser ácido), mientras que el aumento del pH del medio promueve el descenso en la producción de poligalacturonasas y aumento en liasas (cuyo pH óptimo de actividad suele ser mayor) (Bateman, 1966). En muchos casos parece que el tipo de enzimas pécticas asociadas con una enfermedad es el que está mejor adaptado al ambiente generado en la interacción huésped-parásito. Así, la infección de tejidos vegetales por algunos *Fusaria* provoca una desviación alcalina en el pH del tejido infectado y parecen ser liasas las enzimas predominantes asociadas con esta enfermedad (Bateman, 1966; Hancock, 1968; Mullen y Bateman, 1971). En tejidos infectados por *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* se genera un entorno ácido por producción de ácidos orgánicos y son las poligalacturonasas las enzimas pécticas dominantes (Bateman y Beer, 1965; Hancock, 1966). Blais y colaboradores (1992) observaron que, en medios sobre pectina o fragmentos de pared celular de tomate como fuente de carbono, la producción de pectín liasa por FOL y FORL era estimulada cuando el pH había sido ajustado a pH 8,0 al inicio del cultivo fúngico, mientras que la producción de poligalacturonasa era mayor en medios ajustados a pH 5,0.

Como el pH de los cultivos fúngicos cambia durante el crecimiento, puede ser difícil decidir si la aparición de una actividad enzimática es debida a un sustrato inductor o al cambio en el pH. Por tanto, parece interesante estudiar la producción de enzimas pécticas en condiciones de pH constante. El objetivo de este estudio ha sido determinar el tipo de enzimas pécticas producidas por un aislamiento de FORL, en condiciones claramente definidas en cuanto al pH y a los niveles de fuentes de carbono fácilmente metabolizables en el medio de cultivo. Esto fue llevado a cabo en cultivos del aislamiento FORL r2 crecido sobre glucosa, ácido galacturónico o pectina, analizando la evolución en el tiempo de las distintas actividades pécticas y la presencia de formas múltiples de las mismas mediante isoelectroenfoque, durante siete días de crecimiento fúngico.

El experimento se inició con tres días de cultivo en glucosa, para permitir que se alcanzase la fase estacionaria de crecimiento y para poder detectar las actividades enzimáticas que no estuvieran sujetas a represión catabólica. Luego las células fueron transferidas a medio fresco con aporte restrictivo de glucosa, donde presumiblemente se expresarían las enzimas constitutivas sujetas a represión catabólica por glucosa. Por último, las células fueron transferidas a un medio con ácido galacturónico restrictivo, para estudiar las enzimas específicamente inducidas por este sustrato, o mantenidas en glucosa restrictiva como control. Los cultivos fueron tamponados a pH 5,5 y 8,0 para estudiar los efectos del pH sobre la producción de las distintas enzimas pécticas. El hongo también fue cultivado sobre pectina para determinar si eran producidas nuevas y/o diferentes formas de las enzimas pécticas, no presentes en los medios con ácido galacturónico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo fúngico y producción de enzimas**

FORL r2 fue crecido en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio (descrito en el capítulo 2) y diferentes fuentes de carbono en cada caso: glucosa, ácido galacturónico o pectina de manzana. Los cultivos fueron incubados en un agitador orbital (New Brunswick, EEUU) a 150 rpm y 22 °C.

En los cultivos no restrictivos, la glucosa o la pectina fueron añadidas al 0,5 % y en los cultivos restrictivos la fuente de carbono (ácido galacturónico o glucosa) fue añadida mediante cápsulas de difusión (como está descrito por Cooper y Wood, 1973, 1975). Las cápsulas, que contenían ácido galacturónico o glucosa al 30 %, estaban provistas de 4 membranas que permiten la liberación lineal del sustrato durante 24 h, por lo que necesitan ser cambiadas sólo una vez cada día.

Los medios para los cultivos restrictivos fueron tamponados a pH 5,5 con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) y a pH 8,0 con fosfato sódico, ambos 0,05 M. Los medios a pH 5,5 fueron esterilizados a 121 °C (15 min) y los de pH 8,0 por filtración. En estas condiciones el pH del medio se mantenía a pH 5,5 ± 1,0 y 8,0 ± 1 respectivamente. Las cápsulas con las membranas fueron esterilizaron a 121 °C durante 15 min y llenadas con la fuente de carbono (esterilizada por filtración) antes de colocarlas en los cultivos. El pH de los medios con pectina fue ajustado a 5,5 con NaOH antes de la esterilización (121 °C, 15 minutos).

Los matraces fueron inoculados como ha sido descrito previamente (capítulo 2). FORL r2 fue cultivado inicialmente durante tres días en un medio con glucosa al 0,5%; a continuación el cultivo fue centrifugado (1800 g, 30 min) con el fin de transferir toda la biomasa a medio fresco suplementado con una



cápsula con glucosa. Después de un día, la cápsula fue rellena con ácido galacturónico y renovada durante tres días más. Los cultivos control crecieron durante estos tres días en glucosa restrictiva.

Para los cultivos sobre pectina, las células crecidas durante un día en glucosa restrictiva a pH 5,5, fueron resuspendidas en 100 ml de medio fresco con pectina al 0,5 % donde crecieron durante tres días.

Los cultivos fueron recogidos a diferentes tiempos. El crecimiento del hongo fue estimado con una cámara Neubauer por recuento de esporas después de pasar por lana de vidrio. Los cultivos, clarificados por filtración a través de fibra de vidrio, fueron usados para determinar el pH, azúcares reductores (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) y glucosa (método de la glucosa oxidasa-peroxidasa, según Bergmeyer y Bernt, 1974). Después de dializar durante 16-18 horas frente a agua a 5 °C, los filtrados fueron usados para la determinación de las actividades enzimáticas y proteínas.

### **Medida de actividades enzimáticas**

Las actividades pectín y pectato liasa (PNL y PL respectivamente) fueron medidas espectrofotométricamente, determinando el incremento en absorbancia a 235 nm de los productos 4,5-insaturados de las reacciones, y por viscosimetría, a 37 °C para 10 min de reacción, utilizando las mezclas de reacción descritas anteriormente (capítulo 2). Para la valoración de la actividad poligalacturonasa se determinó la liberación de azúcares reductores (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) y el descenso en viscosidad, a 37°C, de las mezclas reacción (descritas en capítulo 2) durante 10 min de reacción.

### **Relación entre descenso en viscosidad y degradación terminal del sustrato**

El descenso en la viscosidad relativa de las mezclas de reacción y la liberación de productos insaturados (en el caso de las liasas) o de azúcares reductores (en el caso de la PG) fue seguido durante 30 min de reacción, con el fin de determinar si la degradación de sustratos pécticos por las enzimas producidas por FORL era de tipo "endo" o "exo".

La viscosidad relativa del sustrato fue definida como  $100 \times (t_i - t_0) / (t_i - t_0)$ , donde  $t_i$  es el tiempo de flujo (segundos) de la mezcla de reacción a diferentes tiempos,  $t_i$  es el tiempo de flujo (segundos) de la mezcla de reacción a tiempo 0 y  $t_0$  el tiempo de flujo (segundos) del tampón. De las curvas de descenso en viscosidad frente al tiempo se dedujo el  $t_{50}$ , tiempo en el cual la viscosidad relativa del sustrato es reducida al 50%,  $((t_i - t_0)/2) + t_0$ . En el tiempo  $t_{50}$  fue calculado el porcentaje de enlaces rotos; para ello los enlaces disponibles al principio de la reacción fueron considerados como 100 %.

### **Determinación de proteínas**

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry (1951), usando seroalbúmina bovina como patrón.

### **Isoelectroenfoque**

Las proteínas de los filtrados de los cultivos fúngicos fueron separadas según su punto isoelectrónico mediante isoelectroenfoque analítico, a 4 °C, en un rango de pH 2-11 con un equipo LKB 2117 Multiphor II (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia).

Las proteínas fueron precipitadas con sulfato amónico al 100 %, a 4 °C, recogidas por centrifugación a 19.000 g durante 30 minutos, dializadas frente a

glicina al 1 % y liofilizadas.

Se utilizaron geles ultrafinos de poliacrilamida de 0,3 mm de grosor con anfolitas de rango de pH 2-11. Las soluciones de poliacrilamida, que contenían acrilamida (Pharmacia) al 7,3 %, bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) (Pharmacia) al 0,2 %, 1,2 ml de anfolitas (Serva), 0,06 ml de persulfato amónico (Pharmacia) al 10 % y 0,2 ml de TEMED (Pharmacia) al 10 %, en un volumen total de 15,0 ml, polimerizaron sobre un GelBond PAGfilm (LKB), usando una unidad UltraMould (LKB). Las tiras de los electrodos fueron sumergidas en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M y NaOH 0,5 M para el ánodo y el cátodo, respectivamente.

El preenfoco de las anfolitas se llevó a cabo a 15 mA durante 45 min. A continuación fueron aplicadas las muestras (10  $\mu\text{g}$  de proteínas en 10  $\mu\text{l}$  de agua) sobre el gel, utilizando papel de fibra de vidrio. El enfoque se realizó a 15 W con un máximo de 1400 V durante 180 min. Los aplicadores de las muestras fueron retirados después de 60 min de enfoque.

Los geles fueron teñidos con plata para la detección de proteínas (Bio-Rad). Para estimar el pI fue utilizada una mezcla de proteínas estandarizada (Broad pI Calibration Kit standards, Pharmacia).

Para la detección de las distintas actividades pécticas en los geles de poliacrilamida fueron utilizados geles de agarosa de 2 mm de grosor, que contenían pectina o ácido poligalacturónico al 0,1 % en los siguientes tampones: Tris-HCl 0,05 M, (pH 8,0) con  $\text{CaCl}_2$  1 mM, para las pectín y pectato liasas, y acetato sódico 0,1 M (pH 5,5) con EDTA 0,01 M, para la poligalacturonasa (Collmer y cols., 1988). Los geles réplica fueron polimerizados sobre un molde constituido por dos placas de vidrio separadas por un espaciador de 2 mm de grosor; en una de las placas se había fijado, mediante una fina capa de agua, una película (GelBond, LKB) que actuó posteriormente como soporte del gel de agarosa.

Después del electroenfoco, los geles de poliacrilamida fueron incubados durante 5 min en el tampón apropiado para cada actividad enzimática. A

continuación, los geles de agarosa fueron colocados sobre su superficie e incubados a 37 °C durante 20 min. Posteriormente, los geles de agarosa fueron teñidos con rojo de rutenio al 0,05 %.

## RESULTADOS

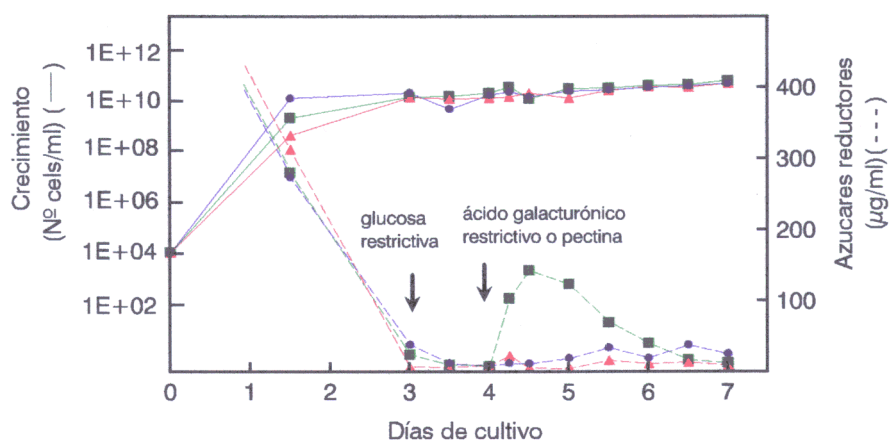
### Crecimiento del hongo en cultivos restrictivos

El crecimiento del hongo en medios tamponado a pH 5,5 ó pH 8,0 y no tamponados aparece comparado en la figura 3.1. En los tres casos, FORL r2 alcanzó la fase estacionaria de crecimiento durante los tres días de cultivo en glucosa. Después de la transferencia de las células a medio fresco (con glucosa o ácido galacturónico restrictivos o con pectina no restrictiva) se mantuvo el número de esporas y no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes pHs y las distintas fuentes de carbono.

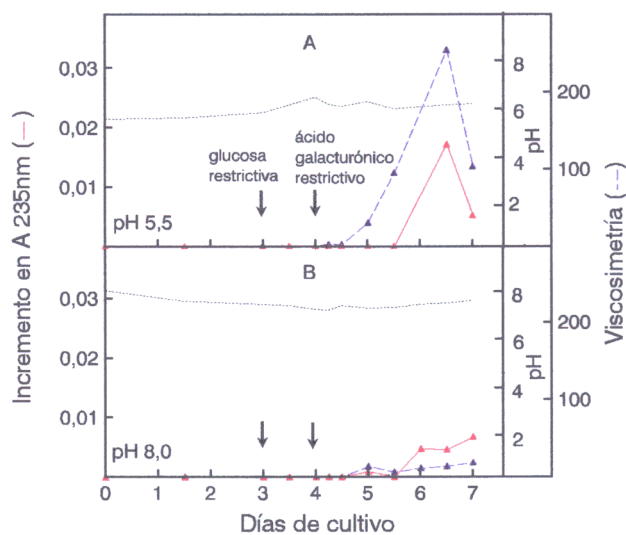
Los azúcares reductores presentes en el medio decrecieron durante los tres primeros días de crecimiento sobre glucosa no restrictiva, desde 50 mg.ml<sup>-1</sup> iniciales a valores por debajo de 40 µg.ml<sup>-1</sup> al tercer día. Posteriormente, durante el crecimiento en glucosa y ácido galacturónico restrictivos, los azúcares reductores se mantuvieron por debajo de este nivel (figura 3.1). Sin embargo, en los cultivos sobre pectina los niveles de azúcares reductores aumentaron, probablemente como resultado de la degradación de pectina por enzimas pécticas presentes en el medio (figura 3.1). En los cultivos restrictivos sobre glucosa, así como en los medios con pectina la glucosa permaneció a un nivel inferior a 12 µg.ml<sup>-1</sup> (datos no mostrados).

### Producción de enzimas pécticas en cultivos restrictivos

La evolución de la actividad pectín liasa durante los siete días de cultivo aparece mostrada en las figuras 3.2A y 3.2B. Durante los cuatro días que el hongo permaneció en glucosa no fue detectada actividad; alcanzó niveles detectables a las 24 h de cultivo sobre ácido galacturónico restrictivo, a ambos valores de pH.



**Figura 3.1.** Crecimiento (----) y niveles de azúcares reductores ( - - - ) en cultivos de FORL r2. El hongo fue primero crecido sobre glucosa no restrictiva durante tres días; a continuación la biomasa fue transferida a un medio con glucosa restrictiva y, después de 24 horas, a un medio con ácido galacturónico restrictivo o pectina no restrictiva. Los medios fueron tamponados a pH 5,5 u 8,0 (en los cultivos con ácido galacturónico) o sin tamponar y ajustado a pH inicial 5,5 (en los cultivos con pectina). Cultivos tamponados a pH 5,5 con ácido galacturónico (●); cultivos tamponados a pH 8,0 con ácido galacturónico (▲); cultivos sobre pectina a pH inicial 5,5 (■). Los datos representan el valor medio de dos experimentos independientes.



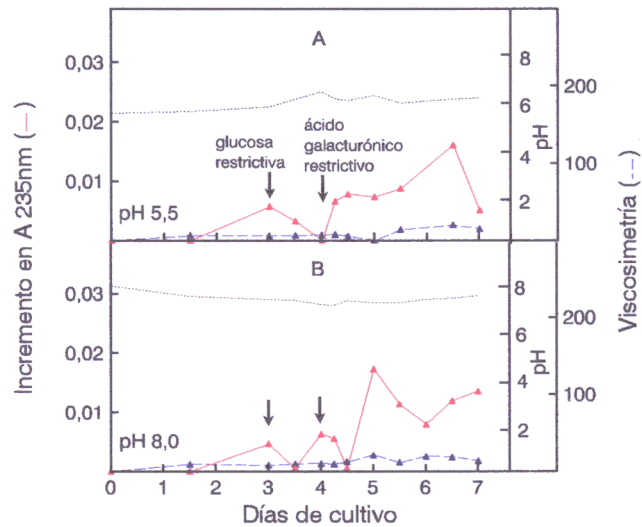
**Figura 3.2.** Evolución de la actividad pectín liasa y cambio del pH en cultivos de FORL r2 sobre ácido galacturónico. A. Cultivos tamponados a pH 5,5. B. Cultivos tamponados a pH 8,0. La actividad enzimática fue determinada por incremento en  $A_{235\text{ nm}}$  (-----) y por viscosimetría (---) a los 10 min de reacción; pH (.....). Para las condiciones de cultivo ver figura 3.1. Los datos representan el valor medio de dos experimentos independientes.

A pH 5,5 (figura 3.2A), la máxima actividad (aumento en  $A_{235\text{nm}}$  y viscosimetría) fue detectada a las 60 h sobre ácido galacturónico. En medios tamponados a pH 8,0 (figura 3.2B), la actividad pectín liasa detectada fue menor, tanto por viscosimetría como por incremento en absorbancia a 235 nm, que en los medios a pH 5,5 y el máximo fue obtenido a las 72 h sobre ácido galacturónico.

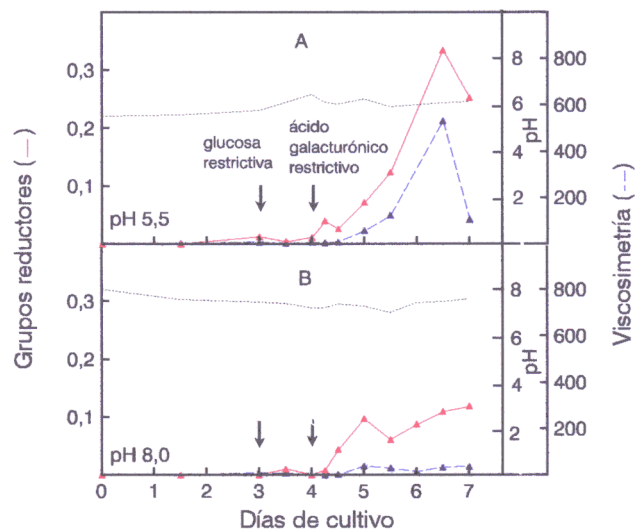
La evolución de la actividad pectato liasa durante los siete días de cultivo es mostrada en las figuras 3.3A y 3.3B. Aunque no hubo actividad en los medios procedentes de las primeras 36 h de crecimiento en glucosa, ni en cultivos tamponados a pH 5,0, ni en cultivos tamponados a pH 8,0, un bajo nivel de actividad fue detectado a los tres días de crecimiento en glucosa (cuando los niveles de azúcares eran muy bajos) y durante las 24 h de crecimiento en glucosa restrictiva a ambos valores de pH. Al igual que la pectín liasa, la actividad pectato liasa aumentó en presencia de ácido galacturónico, alcanzando el nivel máximo en los cultivos tamponados a pH 5,5 a las 60 horas de añadir ácido galacturónico (figura 3.3A).

La evolución de la actividad poligalacturonasa es similar a la de la pectato liasa (figuras 3.4A y 3.4B). La actividad comenzó a ser detectable al tercer día de crecimiento en glucosa, cuando los niveles de azúcares eran muy bajos y aumentó en respuesta al ácido galacturónico restrictivo a ambos valores de pH. En cultivos tamponados a pH 5,5 y a pH 8,0 los máximos se alcanzaron a las 60 y a las 24 horas, respectivamente, de añadir ácido galacturónico.

En los cultivos control, crecidos en glucosa restrictiva desde el tercer día, no fue detectada actividad PNL y sí niveles muy bajos de PL y PG (tabla 3.1).



**Figura 3.3.** Evolución de la actividad pectato liasa y cambio del pH en cultivos de FORL r2 sobre ácido galacturónico. A. Cultivos tamponados a pH 5,5. B. Cultivos tamponados a pH 8,0. La actividad enzimática fue determinada por incremento en  $A_{235\text{ nm}}$  (---) y por viscosimetría (- - -) a los 10 min de reacción; pH (.....). Para las condiciones de cultivo ver figura 3.1. Los datos representan el valor medio de dos experimentos independientes.



**Figura 3.4.** Evolución de la actividad poligalacturonasa y cambio del pH en cultivos de FORL r2 sobre ácido galacturónico. A. Cultivos tamponados a pH 5,5. B. Cultivos tamponados a pH 8,0. La actividad enzimática fue determinada como liberación de azúcares reductores (---) y por viscosimetría (- - -) a los 10 min de reacción; pH (.....). Para las condiciones de cultivo ver figura 3.1. Los datos representan el valor medio de dos experimentos independientes.



**Tabla 3.1.** Actividad pectín liasa (PNL), pectato liasa (PL) y poligalacturonasa (PG) en cultivos de FORL crecidos durante 3,5 días en glucosa restrictiva.

	PNL		PL		PG	
	$\Delta A_{235}$	Vis	$\Delta A_{235}$	Vis	g.r.	Vis
pH 5,5						
U.ml <sup>-1</sup>	0	1,026	0,004	11,74	0,004	7,961
%	0	0,4	2,5	59,1	1,3	1,5
pH 8,0						
U.ml <sup>-1</sup>	0	0	0,031	8,017	0,007	0
%	0	0	26,0	43,5	6,9	0

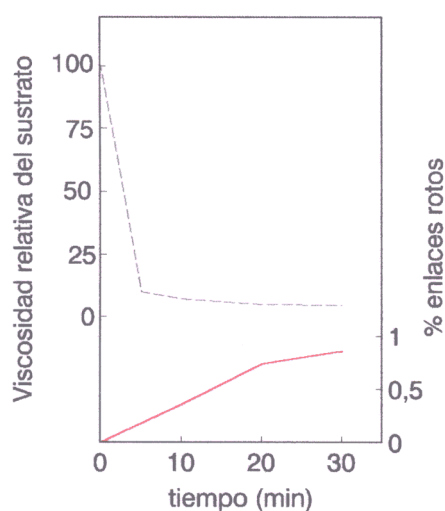
El hongo fue crecido primero sobre glucosa no restrictiva durante tres días, a continuación la biomasa fue transferida a glucosa restrictiva. Los cultivos fueron tamponados a pH 5,5 ó a pH 8,0. La actividades enzimáticas fueron determinadas por incremento en A 235 nm para la PNL y PL, o por liberación de grupos reductores (g.r.) para la PG y por viscosimetría (Vis) en los tres casos. La actividad fue expresada como porcentaje de la máxima actividad detectada en cultivos sobre ácido galacturónico.

En resumen, en cultivos con el mismo número de células, no han sido detectadas actividades PNL, PL ni PG cuando los niveles de azúcares en el medio de cultivo son altos; sí ha sido detectada actividad PL y PG, aunque no PNL, cuando hay bajos niveles de glucosa y sólo en presencia de bajos niveles de ácido galacturónico han sido detectados altos niveles de las tres actividades enzimáticas. Estos resultados indican que estas enzimas pécticas de FORL son inducibles por ácido galacturónico y están sujetas a represión catabólica.

### Tipo de actividades pécticas producidas por FORL r2 en cultivo

La actividad PNL presente en el día de máxima actividad, a las 60 horas de crecimiento sobre ácido galacturónico restrictivo, en medios tamponados a pH 5,5, muestra un comportamiento predominante de tipo "endo". La actividad viscosimétrica es mayor a tiempos de reacción cortos y el descenso en viscosidad relativa de la mezcla de reacción es mayor que la acumulación de productos insaturados (figura 3.2). En el tiempo en el que la viscosidad relativa del sustrato ha sido reducida al 50 % ( $t_{50} = 2.7$  min, en cultivos de 60 h a pH 5.5), el porcentaje de enlaces rotos fue alrededor del 0,1 % (figura 3.5), lo cual indica que la enzima rompe enlaces glicosídicos internos del sustrato, al azar.

Las actividades PL y PG, presentes en los cultivos de FORL tuvieron un modo de acción de tipo "exo" ya que la viscosidad del sustrato no se redujo al 50 % durante los 30 minutos de reacción.



**Figura 3.5.** Modo de acción de PNL producida por FORL. El descenso en la viscosidad relativa de las mezclas de reacción (---) y la liberación de productos insaturados (---) fueron determinados durante 30 min de reacción. Se usaron extractos enzimáticos procedentes de cultivos en 60 h en ácido galacturónico restrictivo a pH 5,5. De las curvas de reducción en viscosidad relativa frente al tiempo, se obtuvo el valor  $t_{50}$  (tiempo en el que se reduce la viscosidad relativa del sustrato al 50 %). Fue calculado el porcentaje de enlaces rotos a este tiempo de reacción. Para detalles ver Materiales y Métodos

### **Múltiples formas de enzimas pécticas de FORL en los cultivos**

Las proteínas fueron separadas según sus puntos isoeléctricos mediante isoelectroenfoque analítico en geles de poliacrilamida con anfolitas en el rango de pH 2-11 y los geles teñidos para las actividades pécticas y para proteínas totales. PNL y PL fueron detectadas usando geles de agarosa que contenían pectina o pectato, respectivamente, en tampón Tris-HCl a pH 8,0 con  $\text{CaCl}_2$ ; se eligieron estas condiciones porque en presencia de  $\text{CaCl}_2$  a pHs inferiores, las bandas eran muy débiles y no se detectó ninguna en presencia de EDTA. Para la detección de la PG los geles de agarosa contenían NaPP en tampón acetato a pH 5,0 con EDTA puesto que con EDTA a pHs superiores, o en presencia de  $\text{CaCl}_2$  a cualquier pH, las bandas eran más débiles.

En la figura 3.6, una composición fotográfica muestra el patrón de actividades pécticas presentes en los cultivos de FORL en el momento de máxima actividad, a los 6,5 días de cultivo. Aparecen incluidas las tres actividades enzimáticas detectadas: PNL, PL y PG en las tres condiciones de cultivo: 60 horas a pH 5,5 sobre ácido galacturónico restrictivo, 60 horas a pH 8,0 sobre ácido galacturónico restrictivo y 60 horas en medio no tamponado sobre pectina. Todas las bandas detectadas en los cultivos de FORL aparecieron en los cultivos de 60 horas a pH 5,5 sobre ácido galacturónico, condiciones en las que también se habían detectado los mayores niveles de las distintas actividades pécticas (figuras 3.2, 3.3 y 3.4), mientras que en los cultivos a pH 8,0 sobre ácido galacturónico o en medios no tamponados sobre pectina algunas de las bandas no fueron detectadas. Los puntos isoeléctricos de las bandas detectadas fueron deducidos de la tinción de plata de las proteínas presentes en el cultivo de 60 horas, a pH 5,5, sobre ácido galacturónico (figura 3.7), revelándose la presencia de tres formas isoenzimáticas con actividad liasa (pIs 9,20, 9,00 y 8,65) y cuatro con actividad poligalacturonasa (pIs 9,30, 7,35, 6,85 y 6,55). La figura 3.8 muestra un esquema de la evolución de las bandas de actividad a lo largo de los siete días de cultivo:

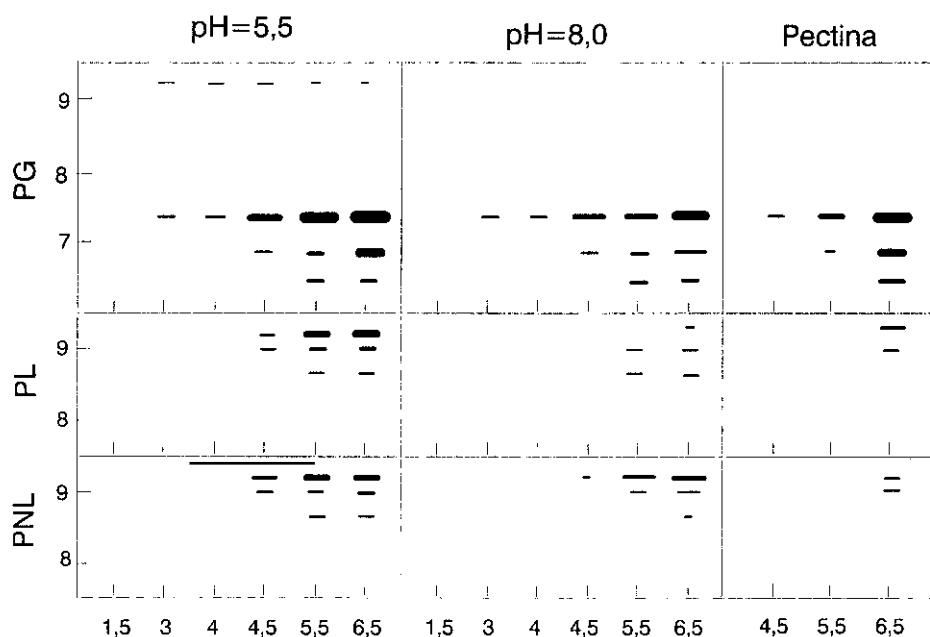
la liasa minoritaria, de pI 8,65 no es detectada en los medios sobre pectina ni siquiera en el momento de máxima actividad y es mucho más débil en los medios a pH 8,0 y, poligalacturonasa de pI 9,30 solo es detectada en los cultivos a pH 5,5 (ver figura 3.6). Las tres liasas dan reacción con ambos sustratos, pectina y pectato, y no se puede deducir una preferencia de sustrato para ninguna de ellas, al comparar las tinciones correspondientes al momento de máxima actividad (60 horas de cultivo a pH 5,5 sobre ácido galacturónico) (figuras 3.6 y 3.8). Sin embargo, cuando los niveles de actividad son más bajos, en los medios a pH 8,0 sobre ácido galacturónico, se aprecia una preferencia por pectina de la isoenzima con pI 9,20 y una preferencia por pectato de las isoenzimas con pIs de 9,00 y de 8,65 (figuras 3.6 y 3.8). Estas diferencias pueden estar relacionadas con los niveles más bajos de actividad detectados en los cultivos tamponados a pH 8,0: cuando los niveles de actividad son altos las liasas pueden actuar sobre ambos sustratos, pectina y pectato, pero cuando los niveles son bajos se aprecia su preferencia por uno de los sustratos.

En los geles de agarosa con pectina también se detectó un banda de pectín esterasa cuyo pI es mayor de 9,30 (figura 3.6).

En los dos días de crecimiento inicial del hongo sobre glucosa no restrictiva no se detecta ninguna de las isoformas pécticas, a ninguno de los dos pHs utilizados. En presencia de glucosa solamente son detectadas débilmente dos bandas de poligalacturonasa (pIs 9,30 y 7,35) al tercer día de cultivo, cuando los niveles de glucosa son muy bajos y en los cultivos sobre glucosa restrictiva (figura 3.8).

**Figura 3.6.** Isoelectroenfoque analítico de las proteínas de FORL crecido en ácido galacturónico restrictivo tamponado a pH 5,5 u 8,0 y en pectina sin tamponar. Las actividades fueron detectadas usando geles réplica de agarosa que contenían el respectivo sustrato. Calles 1, 2 y 3: tinción para actividades sobre geles de agarosa que contenían pectina a pH 8,0; calles 4, 5 y 6: tinción para actividades sobre geles de agarosa que contenían pectato a pH 8,0; calle 7, 8 y 9: tinción para actividades sobre geles de agarosa que contenían pectato a pH 5,0. Calles 1, 4 y 7: cultivos de 60 horas en ácido galacturónico restrictivo a pH 5,5; calles 2, 5 y 8: cultivos de 60 horas en ácido galacturónico restrictivo a pH 8,0; calles 3, 6 y 9: cultivos de 60 horas en pectina. PME: pectín metilesterasa; Ls: liasas; PGs: poligalacturonasas.

**Figura 3.7.** Tinción de plata del gel de isoelectroenfoque analítico. Calle 1: Proteínas de FORL, cultivo crecido en ácido galacturónico restrictivo tamponado a pH 5,5 durante 60 horas, precipitadas con sulfato amónico. Calle 2: Marcadores de pI.



**Figura 3.8.** Esquema de la evolución de las múltiples formas de enzimas pécticas en cultivos de FORL crecido en ácido galacturónico restrictivo, tamponado a pH 5,5 u 8,0 y en pectina sin tamponar. Las proteínas de diferentes tiempos de cultivo (1,5 a 6,5 días) fueron sometidas a isoelectroenfoque y teñidas para actividades PG, PL y PNL.

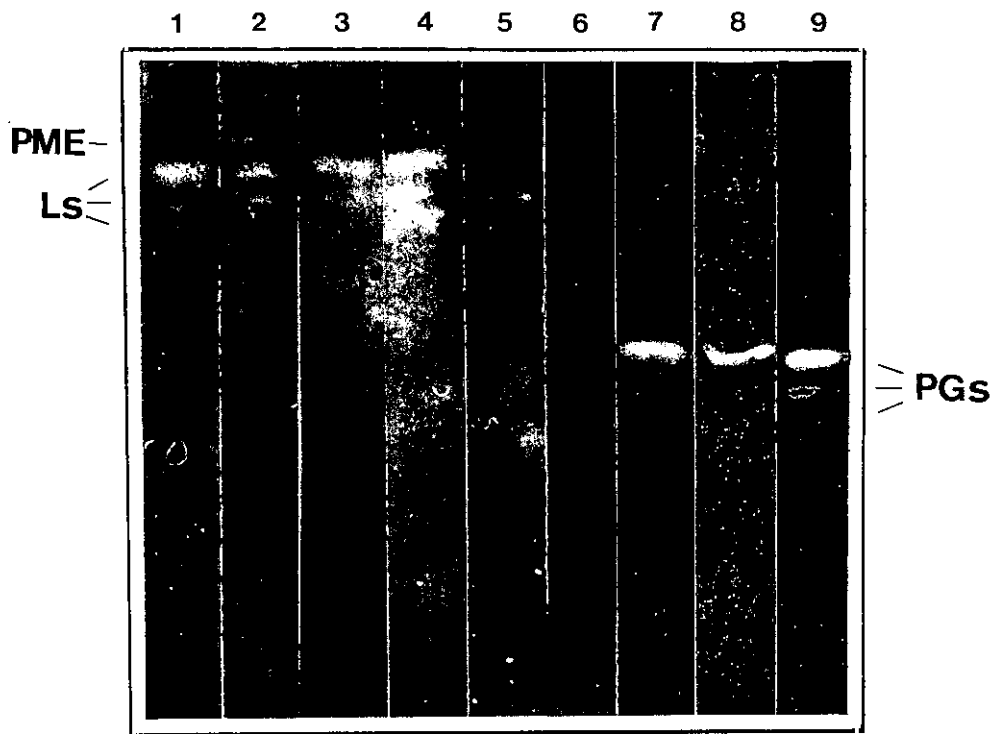


Figura 3.6

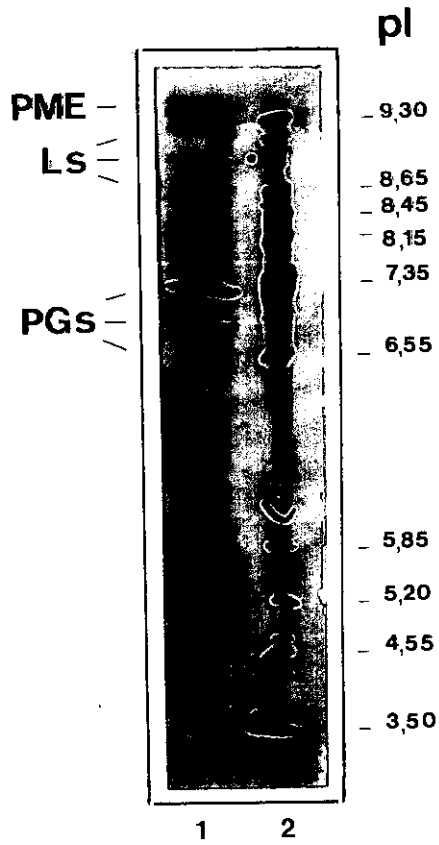
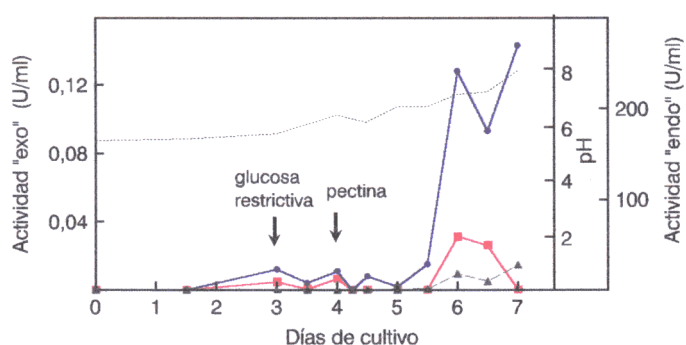


Figura 3.7



### Cultivo sobre pectina

FORL fue crecido en pectina para determinar si nuevas formas isoenzimáticas aparecían sobre este sustrato. La aparición de las tres actividades pécticas, PNL, PL y PG, fue retrasada en los cultivos sobre pectina (figura 3.9) con respecto a los cultivos sobre ácido galacturónico restrictivo (figura 3.2, 3.3 y 3.4) y los niveles de actividad fueron menores. Sólomente se detectaron mayores niveles de actividad pectato liasa. Por otra parte, tal como se describe arriba, no se observaron nuevas bandas.



**Figura 3.9.** Evolución de las actividades pécticas y cambio del pH en cultivos de FORL sobre pectina sin tamponar a pH inicial 5,5. La actividad PNL fue determinada por viscosimetría ( $\blacktriangle$ ), la actividad PL fue determinada como incremento en  $A_{235\text{ nm}}$  ( $\blacksquare$ ) y la actividad PG fue determinada como liberación de azúcares reductores ( $\bullet$ ), pH (...). Para las condiciones de cultivo ver figura 1. Los datos representan el valor medio de dos experimentos independientes.



## DISCUSIÓN

De forma similar a lo que ocurre en otros microorganismos capaces de degradar sustancias pécticas, el aislamiento r2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* produce una serie de enzimas pécticas que difieren en preferencia por sustrato, mecanismo de reacción y modo de acción. En este estudio han sido detectadas tres isoformas con actividad liasa, cuatro con actividad poligalacturonasa y una con actividad pectín metilesterasa. La liasa principal es una forma básica con pI 9,20; las otras dos tienen pIs de 9,00 y 8,65, respectivamente. Las tres liasas actúan sobre pectina y pectato en condiciones alcalinas y tienen un absoluto requerimiento de calcio. La más alcalina tiene una débil preferencia por pectina, mientras que las otras dos son más activas sobre pectato. La PG principal es una forma neutra con pI 7,35; hay dos poligalacturonasas más con pIs 6,85 y 6,55, y una minoritaria con pI 9,30. La presencia de iones calcio y pHs superiores a 5,0 provoca una disminución en la actividad de todas ellas. La PME, que fue detectada en geles de agarosa con pectina, presenta un pI próximo a 9,5. Los puntos isoeléctricos de las poligalacturonasas mayoritarias de FORL r2 son similares a los previamente detectados en varios aislamientos de FORL (Fernández y col., 1993). Sin embargo, la producción de varias isoenzimas de pectín o pectato liasa por FORL no había sido descrita con anterioridad. No obstante, una pectato liasa con pI de 8,7 ha sido descrita en FOL (Di Prieto y Roncero, 1996b), este pI sería similar al de la liasa menos básica de FORL.

La producción de varias formas para una misma enzima ocurre en muchas otras especies de hongos y bacterias. Esto ha sido bien caracterizado en las bacterias fitopatógenas, *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, cuyos complejos de enzimas pécticas extracelulares contienen varias isoenzimas de pectato liasa y poligalacturonasa que difieren en su punto isoeléctrico (Collmer, 1987). No obstante, también existen ejemplos de microorganismos que sólo producen una única enzima péctica como es el caso de *Pseudomonas fluorescens* y *P. viridiflava* que producen una pectato liasa

con pIs 9,7 y 10,0 respectivamente (Liao, 1989). *Phoma medicaginis* va. *pinodella* sintetiza una pectín liasa cuyo punto isoeléctrico es 7,9 (Pitt, 1988). La presencia de múltiples formas de una enzima puede ser una ventaja para el patógeno puesto que algunas formas pueden ser más estables que otras dentro del patógeno. La presencia de múltiples isoenzimas en un organismo puede ser debida a la presencia de varios genes, a diferencias en glicosilación de las proteínas y a modificaciones post-transcripcionales o procesos proteolíticos después de la secreción (Caprari y col., 1993a; De Lorenzo y col., 1987; Tamaki y col., 1988; Willick y Seligy, 1995).

Generalmente, las enzimas catabólicas que degradan sustratos exógenos son inducidas por componentes específicos relacionados estructuralmente con el sustrato y en ausencia de inductor son producidas a bajos niveles. Esta síntesis basal representa unos niveles de actividad enzimática considerablemente más bajos que los detectados en presencia del inductor. La glucosa y otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables reprimen la formación de muchas enzimas catabólicas en bacterias y hongos, fenómeno conocido como represión catabólica (Magasanik, 1961), y que afecta tanto a enzimas inducibles como constitutivas (Collmer, 1987; Cooper, 1983). Las enzimas que están sujetas a represión catabólica están reprimidas durante el crecimiento en glucosa, cuando una fuente de carbono fácilmente metabolizable está disponible y los represores se acumulan en la célula y reprimen su síntesis. La fuente de carbono fácilmente metabolizable que actúa como inductor, puede actuar también como represor, este fenómeno (auto-represión catabólica) es particularmente importante en la regulación de enzimas extracelulares que degradan sustratos complejos, en organismos que están expuestos a condiciones ambientales variables (Collmer, 1987). La producción de poligalacturonato liasa por *Aeromonas liquefaciens* es constitutiva y está sujeta a represión catabólica (Hsu y Vaughn, 1969). Poligalacturonasa y pectín liasa de *Fusarium oxysporum* y *Verticillium albo-atrum* son inducidas por ácido galacturónico y están sujetas a represión catabólica (Cooper y Wood, 1973, 1975). *Fusarium solani* f. sp. *pisi* produce varias pectato liasas con diferente regulación, una inducible por pectina y reprimida por glucosa y otra constitutiva y no sujeta a represión

catabólica (Guo y col., 1995). En *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, la pectato liasa está sujeta a auto-represión catabólica mediada por cAMP cuando su producto, el digalacturonato insaturado, está presente en el medio a altas concentraciones (Collmer, 1987).

FORL fue cultivado en medios tamponados restrictivos para determinar el efecto del pH sobre la producción de enzimas pécticas. De esta forma es posible evitar el aumento en azúcares reductores que sigue a la aparición de picos de actividad enzimática y el incremento de pH que se observa cuando FORL es cultivado sobre pectina (figura 3.9).

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que las enzimas pécticas producidas por FORL r2 son inducidas por ácido galacturónico y están sujetas a represión catabólica. Cuando el micelio de FORL fue transferido a un medio con ácido galacturónico restrictivo, las tres enzimas (PNL, PL and PG) aumentaron (figuras 3.2, 3.3 y 3.4). Para las PG y PL no se observa ninguna fase de retraso que preceda a su aparición pero para la PNL se necesitan 24 horas. Por otro lado, cuando el micelio es transferido a un medio con pectina (figura 3.9), son necesarias 48 horas para detectar el aumento de las tres actividades. Esto hace suponer que el inductor de las enzimas pécticas en FORL es el ácido galacturónico o un metabolito producido a partir de él. La respuesta de PL al ácido galacturónico fue considerablemente menor que la mostrada por PNL y PG (Tabla 3.1). Sin embargo, cuando FORL fue crecido sobre ácido galacturónico no restrictivo, la producción de enzimas pécticas no fue estimulada como en presencia de ácido galacturónico restrictivo (datos no mostrados). Probablemente la presencia de altos niveles de ácido galacturónico provoca auto-represión catabólica. Además, es posible que los niveles basales de PG y PL, detectados en ausencia de inductor, podrían ser útiles cuando FORL se pone en contacto con un polímero péctico: estos niveles basales servirían para liberar del sustrato la molécula inductora, que promovería su propia síntesis así como la de la PNL que no es detectable, ni siquiera a niveles basales, en ausencia del inductor.

Comparando los cultivos tamponados a pH 8,0 ó 5,5, no se han detectado

mayores niveles de liasas en los cultivos pH 8,0. Estos difieren de los tamponados a pH 5,5 en la ausencia de niveles basales de actividad PG durante el crecimiento en glucosa y en los niveles más bajos para las tres actividades durante todo el período de cultivo. Resultados de otros autores, en los que la producción de hidrolasas y liasas es máxima en medios ajustados a pH 5,0 y 8,0, respectivamente, (Bateman, 1966; Bateman y Bashman, 1976; Blais y col., 1992) pueden reflejar efectos del pH sobre la liberación del inductor a partir de sustratos pécticos o sobre la estabilidad de las respectivas enzimas en relación al pH.

La PNL causa un 50 % de descenso en la viscosidad del sustrato cuando sólo se han roto el 0,1 % de los enlaces del polímero (figura 3.5), lo cual indica un comportamiento de tipo "endo". La PL y PG tienen un comportamiento de tipo "exo", puesto que en ningún caso la viscosidad del sustrato es reducida al 50 %. A pesar de que la presencia de varias enzimas pécticas en el medio puede complicar la interpretación de los resultados, las únicas interferencias que pueden haberse dado en este caso son las derivadas de la capacidad de las dos liasas para utilizar ambos sustratos, pectina y pectato. En efecto, como se indicó anteriormente, en las réplicas de agarosa a pH 5,0 las liasas no son detectadas y las poligalacturonasas nunca dan reacción en réplicas con  $\text{CaCl}_2$ .

Es significativo el hecho de que las dos actividades pécticas que están presentes en niveles basales en ausencia de inductor, PL y PG, sean de tipo "exo". A este respecto se ha considerado que las exo-enzimas deberían ser más eficientes que las endo-enzimas en la liberación inicial de inductores solubles a partir de los sustratos poliméricos, proceso que debe preceder a la inducción (Cooper, 1983). La PNL, que exclusivamente es detectada en presencia del inductor y es de tipo "endo", podría jugar un papel importante en la degradación de paredes celulares de tomate. Con muy pocas excepciones, las enzimas capaces de producir maceración y muerte celular son enzimas pécticas de tipo "endo" (Bateman y Bashman, 1976; Cooper, 1983). La endoliasa de *Fusarium solani* f.sp. *pisi* parece ser la enzima involucrada en la invasión de tallos de guisante por el hongo (Crawford y Kolattukudy, 1987). La proliferación de liasas y

poligalacturonasas puede ser necesaria para dar a los microorganismos suficiente capacidad pectolítica o conferir actividades especializadas en la patogénesis (Collmer, 1987). Algunas características de las enzimas pécticas son muy importantes en la patogénesis, como por ejemplo, la capacidad de degradar paredes celulares y causar maceración en los tejidos o el tamaño de la proteína que puede restringir su movimiento a través de las paredes celulares (Cooper, 1983). En la colonización de tejidos radiculares de tomate por FORL, las modificaciones observadas en las paredes celulares del huésped pueden depender de la especificidad de la batería de enzimas pécticas producidas (Brammall y Higgins, 1988a; Charest y col., 1984).

## CAPÍTULO 4.

Análisis de Patrones de Expresión Génica en Presencia  
de Ácido Galacturónico.



## INTRODUCCIÓN

En *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* el ácido galacturónico se ha comportado como inductor de las actividades de varias enzimas pécticas: PNL, PL y PG (capítulo 3). En las condiciones de los experimentos realizados el ácido galacturónico induce la actividad y síntesis de estas enzimas. En *Erwinia chrysanthemi* el galacturonato es catabolizado a piruvato y gliceraldehido-3-fosfato pasando por intermediarios como 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato y 2-ceto-3-deoxi-6-fosfo-D-gluconato, estos últimos parecen tener actividad inductora de las enzimas pécticas (Collmer y Keen, 1986). Además se ha visto que las enzimas pécticas de *E. chrysanthemi* están correguladas con las enzimas catabólicas de sus productos a través del producto de un gen, que reprime a nivel transcripcional muchas de las enzimas encargadas del metabolismo de las sustancias pécticas. En presencia de 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato o derivados, el represor no puede actuar y todos estos genes se expresan (Barras y col., 1994).

Una primera aproximación para averiguar si la inducción de las enzimas pécticas en FORL está regulada a nivel transcripcional es el análisis de las poblaciones de mensajeros de micelio crecido en presencia y ausencia de inductor (ácido galacturónico) mediante la traducción de los mismos en un sistema *in vitro* y posterior separación de los productos por PAGE-SDS (electroforesis unidimensional) y PAGE-2D (electroforesis bidimensional). La primera permite comparar patrones de proteínas en función de su masa molecular, mientras que la segunda separa en función de su punto isoelectrico y su masa molecular. Aun cuando los productos de traducción *in vitro* no son idénticos a las proteínas maduras sí permiten obtener una aproximación válida. Las modificaciones postraduccionales incluyen principalmente pérdida del péptido señal (< 30 aa) y glicosilaciones.

Además de la regulación de las enzimas pécticas se pondrá de manifiesto



la variación en los patrones de expresión génica que sufre el hongo con el paso de glucosa a ácido galacturónico. Un punto intermedio (6 h sobre ácido galacturónico) también ha sido analizado, en él se detecta actividad PG y PL y no PNL (capítulo 3).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material**

El material empleado fue micelio obtenido a partir de cultivos del aislamiento r2 de FORL:

- 36 horas en glucosa al 0,5 %,
- 72 horas en glucosa al 0,5 %, 24 h en glucosa restrictiva y 6 horas en ácido galacturónico restrictivo, y
- 72 horas en glucosa al 0,5 %, 24 h en glucosa restrictiva y 60 horas en ácido galacturónico restrictivo.

Las condiciones de cultivo aparecen detalladas en el capítulo 3.

### **Extracción de RNA**

El RNA total fue extraído a partir de micelio según el método fenol/SDS (Ausubel y col., 1987) con ligeras modificaciones. El material congelado (1-1,5 g) fue triturado, en mortero con nitrógeno líquido, hasta que se formó un polvo fino. Este polvo fue transferido a un tubo de 50 ml con 15 ml de tampón de extracción TLE (Tris 0,18 M, LiCl 0,09 M, EDTA 4,5 mM y SDS 1 %, a pH 8,2) y 15 ml de una mezcla 1:1 de fenol equilibrado con TLE y cloroformo. Fue homogeneizado en un vortex e incubado a 50 °C durante 20 min. A continuación, centrifugado 20 min a 8000 g. La fase acuosa fue lavada tres veces con la mezcla de fenol y cloroformo y extraída lavando una vez más con cloroformo. El RNA fue precipitado con LiCl 8 M hasta una concentración final en cada tubo de 2 M durante una noche, a 4 °C. Después de una centrifugación a 8000 g durante 20 min, el precipitado fue lavado con LiCl 2 M, resuspendido en 100 µl de agua y precipitado con acetato sódico 3 M pH 5,2 (1/10 vol) y 2,5 vol de etanol al 100

% durante una noche a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ó 1 h a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El precipitado recogido después de la centrifugación fue lavado con etanol al 70 % y resuspendido en agua, de esta forma se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de RNA fue estimada por absorción a 260 nm, asumiendo que una concentración de  $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  da una unidad de densidad óptica. Su integridad fue comprobada en geles de agarosa en formamida como se indicará en el capítulo 5.

Todas las soluciones utilizadas, a excepción del cloroformo, fenol y TLE, fueron esterilizadas a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min en autoclave. Al agua utilizada se le añadió dietil pirocarbonato y se mantuvo una noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de la esterilización.

### **Traducción *in vitro***

10  $\mu\text{g}$  de RNA total fueron traducidos *in vitro* con extracto de germen de trigo (Promega) en presencia de  $^{35}\text{S}$ -metionina (ICN,  $1000\text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$  a  $10\text{ mCi}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ . RNA (1  $\mu\text{g}$ ) del virus del mosaico del bromo fue usado como control. A continuación, las muestras fueron liofilizadas.

### **Electroforesis**

Los productos de la traducción fueron separados por electroforesis bidimensional y unidimensional. En la primera fueron separados según el punto isoeléctrico (primera dimensión) y peso molecular (segunda dimensión), en la unidimensional sólo según peso molecular.

La primera dimensión fue realizada en un equipo GT Series Gel Electrophoresis Unit (Hoefer Scientific Instruments). Fueron usados geles cilíndricos de 11 cm de largo por 2 mm de diámetro. La composición para 10 ml

fue 4,8 g urea, 1,4 ml de acrilamida (acrilamida 28,4 % y bisacrilamida 1,6 %), 2 ml de NP-40 al 10 % y 8  $\mu$ l de anfolitas de rango 3-10 y 32  $\mu$ l de rango 5-7. Una vez polimerizado fue equilibrado durante 2 h con 20  $\mu$ l de tampón A (urea 9,5 M, NP-40 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % y anfolitas 2 %), y 10  $\mu$ l de agua. Antes de aplicar la muestra los geles se precorrieron con 20  $\mu$ l de tampón A fresco a voltaje constante (15 min a 200 V, 30 min a 400 V y 30 min a 600 V). En la cubeta superior (cátodo) fue colocado NaOH 0,02 M y en la inferior (ánodo)  $H_3PO_4$  0,01 M. Las muestras (el producto correspondiente a una traducción) fueron aplicadas disueltas en 25  $\mu$ l de tampón A y cubiertas con 10  $\mu$ l de tampón K (urea 9 M y anfolitas 1 %). La electroforesis se corrió a voltaje constante (15 h a 600 V y 1 h a 800 V). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron durante 10 min con tampón O (glicerol 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 %, SDS 2,5 % y Tris-HCl 0,625 M, a pH 6,8).

La segunda dimensión y las unidimensionales fueron realizadas según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970) en un equipo Vertical Slab Gel Unit Model SE400, The Sturdier (Hoefer Scientific Instruments). El gel separador fue preparado en un volumen de 20 ml con 8 ml de acrilamida (acrilamida 30 % y bisacrilamida 0,8 %), 7,5 ml de Tris-HCl al 1 M y pH 8,8, 100  $\mu$ l de SDS al 20 %, 16  $\mu$ l de TEMED y 16  $\mu$ l de persulfato amónico al 10 %. El gel concentrante fue preparado en un volumen de 10 ml con 1,7 ml de acrilamida, 1,25 ml de Tris-HCl a 1 M y pH 6,8, 50  $\mu$ l de SDS al 20 %, 10  $\mu$ l de TEMED y 40  $\mu$ l de persulfato amónico al 10 %. En las bidimensionales, el gel cilíndrico de la primera dimensión fue colocado encima del gel concentrante; en las unidimensionales, la muestra fue aplicada dentro de los pocillos del gel (el producto correspondiente a la mitad de una traducción). El tampón de electroforesis fue glicina 14,4 % y SDS 1 % en Tris-HCl 50 mM pH 8,3. Se corrió a corriente constante (30 mA).

## **Detección**

La detección fue realizada por fluorografía; para ello los geles, fijados con una solución metanol:acético:agua (40:10:50) durante la noche, fueron incubados 30 min con En<sup>3</sup>hancer (Dupont) y secados a 50 °C durante 45 min en vacío. La exposición fue llevada a cabo a -80 °C en oscuridad con una película Kodak X-OMAT-AR durante 15 días para las bidimensionales y 4 días para las unidimensionales.

## **Análisis de los resultados**

La posición relativa de cada mancha o polipéptido no varía y depende de su punto isoeléctrico y su masa (en electroforesis bidimensionales) o sólo de su masa (en unidimensionales). El conjunto de todas ellas, o patrón, fue comparado en las dos situaciones principales, estudiando la presencia o ausencia de manchas concretas y de variaciones relevantes en su intensidad. Sólo fueron considerados aquellos cambios reproducibles en las distintas repeticiones de cada patrón y se analizaron las zonas cuya resolución hacía posible el análisis.

Las bandas fueron caracterizadas en función de su punto isoeléctrico y su masa molecular. Para lo primero fue medido el pH de los geles cilíndricos de la primera dimensión partiéndolo en lonchas, disolviéndolo en agua y a continuación midiendo el pH. Para lo segundo marcadores de peso molecular entre 97,4 y 14,4 kDa (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range. Bio-Rad) fueron cargados y teñidos con azul de Comassie al 0,2 % en metanol:acético:agua (40:10:50).

## RESULTADOS

El patrón de proteínas sintetizadas a partir de RNA de micelio crecido en ácido galacturónico restrictivo fue comparado con el del crecido en glucosa en electroforesis bidimensional (figuras 4.1 y 4.2) y unidimensional (figura 4.3).

Las fotos de electroforesis bidimensionales aparecen divididas en cuadrantes para facilitar la localización de las proteínas (figuras 4.1 y 4.2). Los patrones proteicos presentan gran similitud, la mayor parte de las proteínas presentan un punto isoelectrico cercano a la neutralidad y peso molecular entre 20 y 60 kDa (cuadrante 2.2). La comparación entre el patrón de glucosa y ácido galacturónico revela, en general, una disminución en el número e intensidad de las manchas en el patrón de galacturónico. Un esquema de los cambios más significativos aparece en la tabla 4.1. A las manchas que aparecen o aumentan en intensidad en presencia de ácido galacturónico, se les ha designado un número; para la denominación de cada mancha se ha tenido en cuenta el cuadrante en el que se encuentra y el número asignado. A continuación se hace un estudio más detallado por cuadrantes.

En el cuadrante 1.1 se observa el descenso en intensidad de bastantes manchas, y el ligero aumento de una de 74 kDa (1.1-1).

En el cuadrante 1.2 se observan muchas menos manchas que en el cuadrante 1.1. En el patrón de ácido galacturónico, las manchas aparecen mucho menos intensas que en el de glucosa hasta tal punto que es difícil concluir si han desaparecido algunas. No obstante parece claro que no se detecta ninguna nueva.

En el cuadrante 2.1 se observa la desaparición de varias manchas de pesos moleculares próximos a 27 kDa, el descenso en intensidad de algunas y, lo que es más importante, el aumento en cuatro manchas, una de 52 (2.1-1), una de 36 (2.1-2) y, dos de 24 kDa (2.1-3, 2.1-4).

En el cuadrante 2.2, en el patrón de ácido galacturónico se observa la

disminución en intensidad de muchas manchas y la desaparición de algunas de ellas como una de 42 kDa y de un grupo de cuatro de aproximadamente 28 kDa. Seis manchas parecen aumentar en intensidad, una de 55 kDa (2.2-1), una de 42 kDa (2.2-2), una de 41,5 kDa (2.2-3), dos de 39 kDa (2.2-4, 2.2-5) y una de 36 kDa (2.2-6). En este cuadrante también se observan tres péptidos nuevos, dos de 36 kDa (2.2-7, 2.2-8) y uno de 30 kDa (2.2-8). La mayor intensidad en algunas manchas en el patrón de glucosa, podría enmascarar a varias proteínas.

En el cuadrante 2.3 se observa una disminución en la intensidad de las manchas que en algunos casos llegan a desaparecer. No se detectó ninguna mancha nueva.

En el cuadrante 3.1 se observa la desaparición o menor intensidad de varias manchas y el aumento de una de 22 kDa (3.1-1).

En el cuadrante 3.2 aparecen pocas manchas, en el patrón de ácido galacturónico las manchas aparecen mucho menos intensas, dos de ellas desaparecen claramente y aparece una de muy bajo peso molecular, menor de 14 kDa (3.2-1), casi a la altura del frente.

**Figura 4.1.** 2D-PAGE de los productos obtenidos por traducción *in vitro* de RNA extraído de micelio de FORL r2 crecido 36 horas en glucosa (A) o después de 60 horas en ácido galacturónico restrictivo (B). Para ver condiciones de cultivo ver capítulo 3. Sólo las manchas que aumentaban en intensidad o aparecían nuevas en el patrón procedente del cultivo en ácido galacturónico fueron numeradas; la desaparición o descenso en intensidad ha sido sólo señalado en algunos casos. Los cambios se marcan con la siguiente nomenclatura (▼) aparición de mancha, (∇) desaparición de mancha, (↑) aumento de la mancha, y (↓) descenso de la mancha.

**Figura 4.2.** Detalle del cuadrante 2b de 2D-PAGE de los productos obtenidos por traducción *in vitro* de RNA extraído de micelio de FORL r2 crecido 36 horas en glucosa (A) o después de 60 horas en ácido galacturónico restrictivo (B). Solo las manchas que aumentaban en intensidad o aparecían nuevas en el patrón procedente del cultivo en ácido galacturónico fueron numeradas. Los cambios se señalaron con la siguiente nomenclatura (▼) aparición de mancha, (∇) desaparición de mancha, (↑) aumento de la mancha, y (↓) descenso de la mancha.

**Figura 4.3.** SDS-PAGE de los productos obtenidos por traducción *in vitro* de RNA extraído de micelio de FORL r2 crecido: calle 1, 36 horas en glucosa; calle 2, 6 horas en ácido galacturónico restrictivo; y calle 3, 60 horas en ácido galacturónico restrictivo. Para condiciones de cultivo ver capítulo 3.

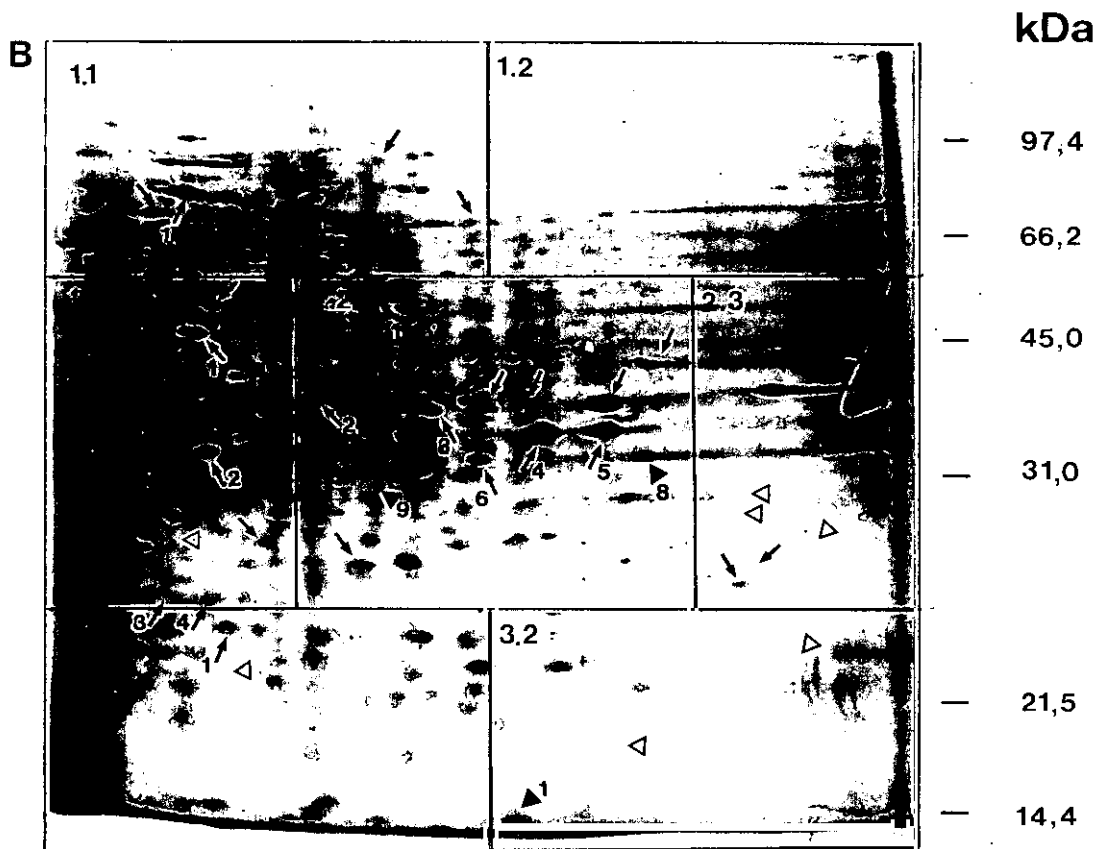
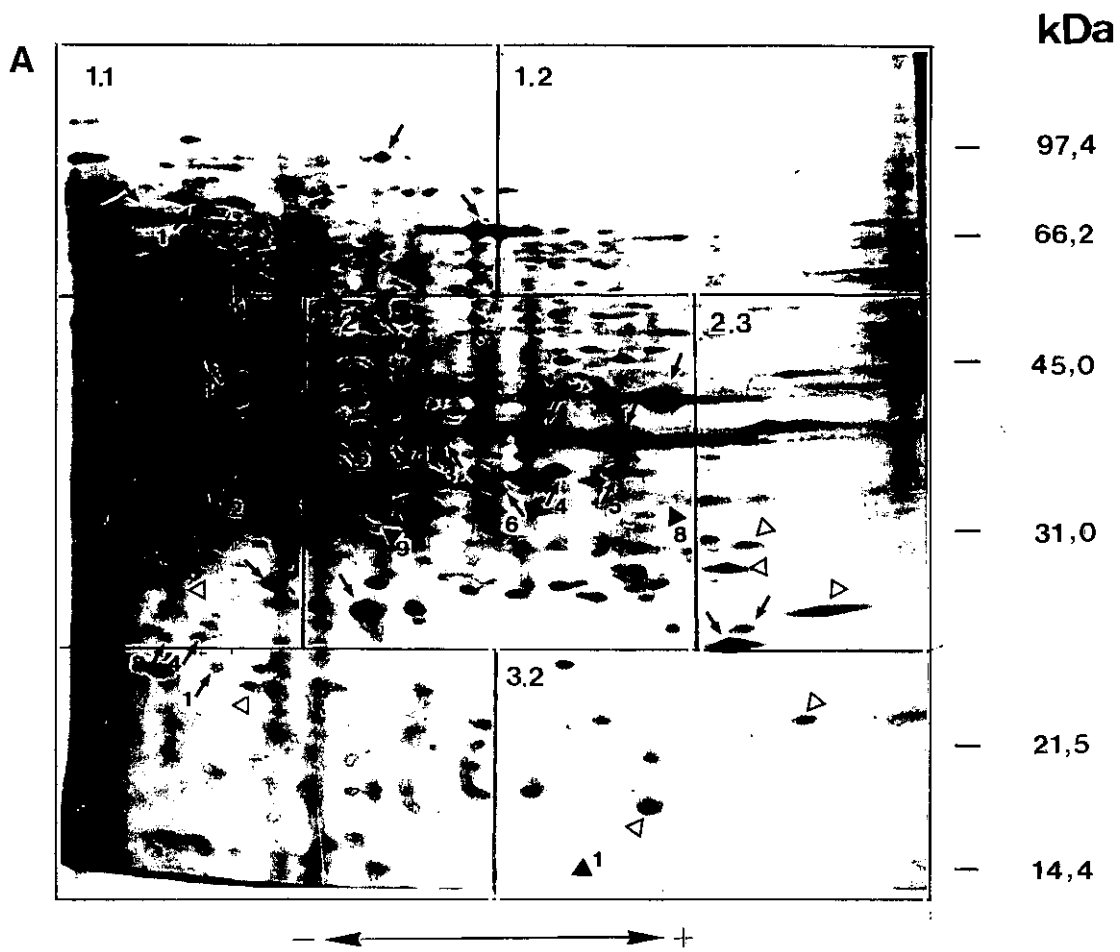


Figura 4.1.





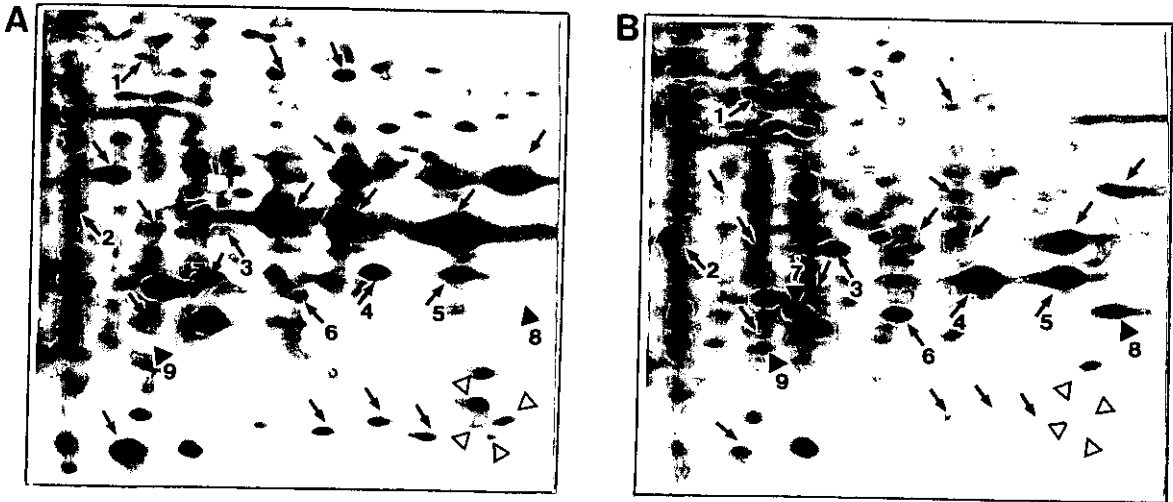


Figura 4.2.

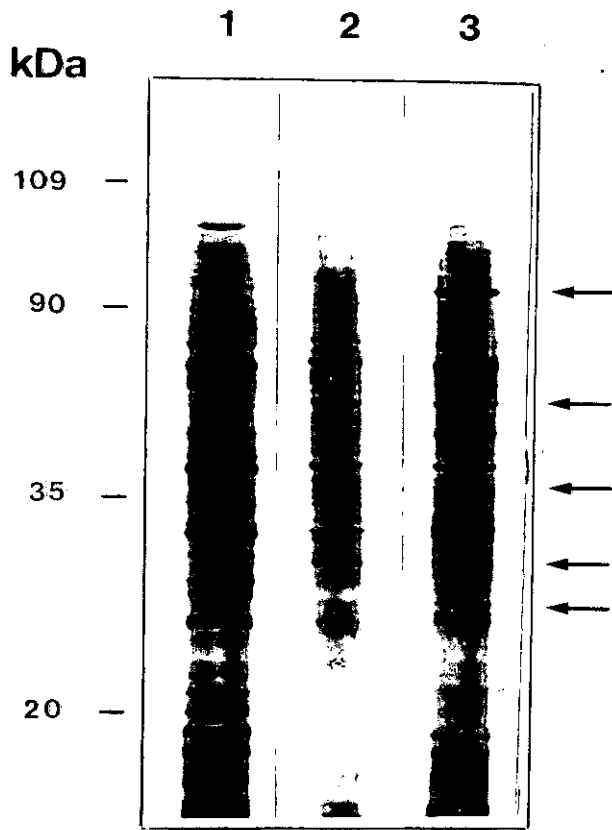


Figura 4.3.



**Tabla 4.1.** Tabla resumen de los resultados obtenidos por 2D-PAGE de los productos de la traducción *in vitro* del RNA extraído a partir de micelio crecido: 36 horas en glucosa y 60 horas en ácido galacturónico. Sólo se tiene en cuenta la aparición o el aumento de las manchas. (-) ausencia de mancha, (+) presencia de mancha, y (++) aumento de la mancha. (1) A las 6 h de ácido galacturónico ya aparece la mancha. (2) A las 6 h de ácido galacturónico no aparece la mancha.

Localización	Masa Molec. (kDa)	Glucosa	60 horas ácido galacturónico
1.1-1	74	+	++
2.1-1	52	+	++
2.1-2	36	+	++
2.1-3	24	+	++
2.1-4	24	+	++
2.2-1	55	+	++
2.2-2	42	-( <sup>1</sup> )	++
2.2-3	41,5	+	++
2.2-4	39	+	++
2.2-5	39	+	++
2.2-6	36	+	++
2.2-7	36	-( <sup>2</sup> )	+
2.2-8	36	-( <sup>1</sup> )	++
2.2-9	30	-( <sup>1</sup> )	++
3.1-1	22	+	++
3.2-1	14	-( <sup>2</sup> )	+

Dos de las manchas que aparecen nuevas en el patrón de 60 horas sobre ácido galacturónico, 2.2-8 y 2.2-9, aparecen ya a las seis horas, mientras que las otras dos, 2.2-7 y 3.2-1, no aparecen en este patrón.

En electroforesis unidimensionales a primera vista se pudo apreciar que en el patrón de glucosa se detectan más bandas (figura 4.3), en presencia de ácido galacturónico algunas bandas desaparecen y otras disminuyen su intensidad. No obstante, se detectan también bandas con mayor intensidad o nuevas. A las 6 h se detectó una banda de 27 kDa y una de 30 kDa que no aparecían en glucosa, también se detecta el aumento en intensidad de una de 31 kDa. A las 60 h estas dos bandas aparecieron más intensas, se detectó una nueva de 35 kDa y una de 55 kDa apareció mucho más intensa. Una banda de 83 kDa fue también sólo detectada a las 60 horas de ácido galacturónico. Un resumen de estos datos aparece en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Tabla resumen de los resultados obtenidos por SDS-PAGE de los productos de la traducción *in vitro* del RNA extraído a partir de micelio crecido: 36 horas en glucosa, 6 horas en ácido galacturónico y 60 horas en ácido galacturónico. (-) ausencia de mancha, (+) presencia de mancha, y (++) aumento de la mancha.

Masa Molecular (kDa)	Glucosa	6 horas ácido galacturónico	60 horas ácido galacturónico
83	-	-	+
55	+	+	++
35	-	-	+
31	+	++	++
30	-	+	++
27	-	+	++

## DISCUSIÓN

La presencia de ácido galacturónico como única fuente de carbono reduce la diversidad de transcritos de forma significativa; en una comparación general se deduce una reducción en la población de transcritos al pasar de glucosa a ácido galacturónico. El cambio de fuente carbonada irá acompañado de variación en las enzimas implicadas en su metabolismo, aparentemente en una situación fisiológica más pobre. Hay que tener en cuenta que durante 60 horas el aporte es restrictivo, el hongo no tiene fuente de carbono en abundancia por lo que bajarán probablemente los niveles de transcripción y, por lo tanto, la síntesis de proteínas totales. Sólo algunas proteínas serán necesarias en esta nueva situación y, por lo tanto, aumentarán en cantidad o aparecerán de nuevo. El ácido galacturónico se revela como un inductor a nivel transcripcional y su presencia induce la síntesis de novo o el aumento de la síntesis de algunos transcritos. No sólo se verán afectadas las enzimas pécticas, es probable que alguna enzima involucrada en el metabolismo del ácido galacturónico aumente. Es posible una regulación conjunta de las enzimas pécticas con las enzimas encargadas del metabolismo de los productos de ellas como ocurre en *Erwinia chrysanthemi* (Barras y col., 1994).

Se ha realizado un intento de asignación de polipéptidos inducidos por ácido galacturónico en base a las masas moleculares de enzimas pécticas descritas en otras especies de *Fusarium*.

El análisis de los productos obtenidos a partir de la traducción *in vitro* y separados en una única dimensión revela una inducción de la síntesis de mRNA que codifican para seis péptidos de peso molecular 27, 30, 31, 35, 55 y 83 kDa, cuando el micelio fue crecido con ácido galacturónico restrictivo como inductor (figura 4.3). Se prestó particular atención a las cinco primeras puesto que tenían pesos moleculares similares a las enzimas pécticas ya descritas en otros *Fusarium* (De Lorenzo y col., 1987; Crawford y Kolattukudy, 1987).

El péptido de 55 kDa podría corresponder a una PG puesto que su peso molecular es similar al de dos polipéptidos de 45 y 51 kDa que corresponden a poligalacturonasa de *Fusarium moniliforme* (De Lorenzo y col., 1987). Éstas han sido identificadas por inmunoprecipitación, con anticuerpos para poligalacturonasa, de los productos obtenidos a partir de la traducción *in vitro* de RNA del hongo crecido en condiciones de inducción de poligalacturonasa. Por otra parte se ha observado que FORL produce una PG cuya forma desglicosilada tiene un tamaño de 50 kDa (Patiño y col., en preparación). Esta banda es detectada en las muestras procedentes de cultivos en glucosa (36 h) y aumenta en las muestras procedentes de cultivos a las 60 horas en ácido galacturónico. Con relación a actividades, PG es detectable al final del cultivo en glucosa, cuando los niveles de glucosa son bajos, y aumenta en presencia de ácido galacturónico, siendo el máximo a las 60 h (capítulo 3). La presencia de esta banda en el patrón de 36 h en glucosa, puede indicar la presencia de niveles basales en estas condiciones, no detectados por los métodos usados para las valoraciones enzimáticas. La intensidad de la banda aumenta considerablemente a las 60 h en ácido galacturónico restrictivo, siendo los altos niveles de actividad detectados a las 60 h debidos a un aumento en la transcripción y por lo tanto en la cantidad de enzima.

Las bandas de 27, 30, 31 y 35 kDa pueden corresponder a liasas. En *Fusarium solani* f. sp. *pisi* se ha detectado un péptido de 29 kDa que corresponde a una pectato liasa (Crawford y Kolattukudy 1987). Además, estos pesos moleculares están de acuerdo con los observados en otras liasas. La actividad PNL es detectada a partir de 24 h en ácido galacturónico, no así la PL que es detectada ya en el cultivo en glucosa. Ambas actividades alcanzan su máximo a las 60 horas en ácido galacturónico (capítulo 3).

La banda de 31 kDa es detectada en glucosa y aparece con mayor intensidad en presencia de ácido galacturónico desde las 6 horas. Previamente, se ha hablado de una actividad PL presente en glucosa que aumenta en los cultivos de ácido galacturónico (capítulo 3); esta actividad podría corresponder a esta

proteína.

La banda de 35 kDa no es detectada a las 6 h, pero sí a las 60 h cuando las actividades son máximas. Ésta podría corresponder a una PNL puesto que su actividad no es detectada hasta las 24 h de ácido galacturónico (capítulo 3).

Las bandas de 27 y 30 kDa son detectadas a las 6 horas y aumentan a las 60 horas. Teniendo en cuenta la existencia de dos PL y una PNL descritas en el capítulo 3, una de éstas correspondería a una PL; el hecho de que a las 6 h no haya mensajeros pero sí haya actividad podría ser explicado por la existencia de dos formas con la misma actividad liasa, una sería sintetizada en presencia de glucosa y la otra en presencia de ácido galacturónico.

Las electroforesis bidimensionales proporcionaron mayor información, ya que el nivel de separación era mayor. Coincidiendo con las unidimensionales, se observó un patrón más complejo en las muestras procedentes de tejidos crecidos en glucosa. Algunos de los cambios observados en las unidimensionales fueron confirmados en las bidimensionales. La banda de 55 kDa, probablemente una PG, se corresponde con la mancha 2.2-1; el comportamiento es el mismo. En cuanto a la banda de 35 kDa, existen varias manchas con una masa similar, 2.1-2, 2.2-6, 2.2-7 y 2.2-8. No obstante, la 2.2-7 tiene un comportamiento más similar al esperado: ausencia en glucosa y a las 6 h de ácido galacturónico, y presencia a las 60 h de ácido galacturónico. El péptido de 30 kDa, que aparece en las unidimensionales, podría corresponder al 2.2-9: ambos tienen el mismo peso molecular y el mismo comportamiento, ausencia en glucosa y presencia en ácido galacturónico. En cuanto a las bandas correspondientes a 31 y 27 kDa, no se puede hacer una asignación directa. Las restantes manchas pueden corresponder a otras actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del ácido galacturónico que, en su presencia o en la de algún producto resultante de él, aumentan su expresión.

Una correspondencia entre los dos tipos de electroforesis, unidimensional y bidimensional sería lógica, pero no tienen por qué coincidir exactamente. Las



diferencias aparentes en los dos tipos de electroforesis pueden ser debidas al solapamiento existente entre bandas en las electroforesis unidimensionales. Por otro lado, la falta de alguna mancha en las bidimensionales, péptidos de 31 y 27 kDa, puede ser debida a que estas proteínas sean muy básicas y no entren en el gel en la primera dimensión. Hay que tener en cuenta que las liasas descritas en este trabajo tienen un punto isoeléctrico muy alcalino (9,20, 9,00 y 8,65). Es por ésto por lo que se hace necesaria la separación de los productos de traducción *in vitro* por las dos técnicas (electroforesis uni y bidimensionales)

La obtención de anticuerpos para las distintas enzimas pécticas y su empleo frente a los productos obtenidos en la traducción *in vitro*, sería de gran utilidad para confirmar las asignaciones de las distintas bandas o manchas a las distintas enzimas pécticas o a otras enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido galacturónico.

## CAPÍTULO 5.

Obtención de Sondas para Poligalacturonasas y Liasas  
Pécticas. Control Genético.



## INTRODUCCIÓN

*Fusarium oxysporum*, como todos los Deuteromycetes, posee un ciclo de vida asexual. Carece, o al menos no se conocen, procesos de reproducción sexual y sus células son haploides en todo su ciclo. El tamaño del genoma varía de 18,1 a 51,5 Mb dependiendo de la especie y forma especial; incluso se han descrito variaciones dentro de esta última. En un aislamiento de FOL se han descrito 10 cromosomas con un tamaño total de 42,2 Mb (Migheli y col., 1993). El 68 % del genoma de FOL son secuencias de una única copia, el 12 % son copias múltiples y el 20 % son repetidas (Elias y col., 1993). La falta de procesos de reproducción sexual en *F. oxysporum* dificulta un análisis genético convencional.

El control genético de las enzimas pécticas está dilucidado sólo en algunos casos. Existe un alto grado de polimorfismo que parece ser debido tanto a la presencia de varios genes como a modificaciones postranscripcionales.

En el caso de las liasas, el sistema más conocido es el de las bacterias del género *Erwinia*. En *E. chrysanthemi* la actividad pectato liasa resulta principalmente de la acción de cinco endo-enzimas codificadas por los genes *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD* y *pelE*. Estos genes están organizados en dos grupos o clusters -*pelB*, *pelC* y *pelA*, *pelE*, *pelD*- (Collmer, 1986). A parte de estos genes han sido clonados: un gen *pelX*, que codifica para una exo-pectato liasa periplásmica y dos genes, *pelL* y *pelZ*, que codifican para pectato liasas secundarias (Hugouvieux-Cotte-Pattat y col., 1996). Los genes *pel* de *E. carotovora* difieren de los de *E. chrysanthemi*. Han sido clonados tres genes que codifican para endo-pectato liasas extracelulares, dos para endo-pectato liasas periplásmicas y un gen para pectín liasa (Barras y col., 1994).

Los sistemas de hongos se conocen menos. En *Aspergillus niger*, se han encontrado seis genes que codifican para pectín liasas, de los cuales tres han sido clonados y secuenciados (Gysler y col., 1990; Harmse y col., 1990; Kuster-van

Someren y col., 1992). De *Fusarium*, sólo se conocen datos de *F. solani* f. sp. *pisi*; se han descrito cuatro genes para pectato liasas, *pelA*, *pelB*, *pelC* y *pelD* (González-Candelas y Kolattukudy, 1992; Guo y col., 1995a, b, 1996).

La expresión de estos genes está regulada a nivel transcripcional en la mayoría de los casos, inducción por sustancias pécticas y represión catabólica por glucosa. En *E. chrysanthemi* se ha descrito una regulación conjunta (Barras y col., 1994). En *F. solani* la regulación es diferente para cada gen. La expresión de *pelA* es inducida por pectina y reprimida por glucosa, la de *pelB* es constitutiva y no está sujeta a represión catabólica, y *pelD* sólo se expresa en planta (Guo y col., 1995a, 1996).

La comparación de secuencias disponibles revela una escasa homología. En *Erwinia*, las secuencias estudiadas se han agrupado, teniendo en cuenta su homología, en dos familias: *pelADE* y *pelBC*. Las secuencias de las enzimas periplásmicas y de *pelL* y *pelZ* que presentan poca homología formarían nuevas familias (Hugouvieux-Cotte-Pattat y col., 1996). Dentro de cada familia, la similitud es del 50 %, pero la homología baja cuando se compara con otros organismos (Heffron y col., 1995). Otras bacterias fitopatogénicas, como *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Bacillus*, exhiben una identidad a nivel de aminoácidos del 35 al 43 % con la familia *pelADE*, y del 18 al 20 % con la familia *pelBC* u otras (Liao y col., 1996). En *Fusarium solani*, el gen *pelA* presenta una homología muy limitada con otras secuencias, incluso con las pectín liasas de *A. niger*, muestra sólo identidad del 20 al 25 %. La comparación con otras secuencias de pectato liasas bacterianas o fúngicas y con pectín liasas ha revelado la conservación de solo nueve aminoácidos (González-Candelas y Kolattukudy, 1992). Los genes *pelB* y *pelC* presentan una identidad en aminoácidos del 65 y 51 % respectivamente con la PLA, pero ninguna homología significativa con otras enzimas pectinolíticas (Guo y col., 1995a, b). La secuencia de nucleótidos de *pelD* muestra semejantes niveles de identidad, 49, 44, y 65 % con PLA, PLB y PLC (Guo y col., 1996).

A pesar de la escasa homología, se han podido detectar tres secuencias consenso (i) (D/E)(G/S)-hDh--(A/G)(S/A)--hThS (donde h puede ser I, L o V), (ii) h--R-P--R-G-hH--NN-Y, y (iii) (S/A/T)--hWVDH--h (Barras y col., 1994). No obstante, en algunos casos sólo se encuentran algunos motivos como en *Pseudomonas marginalis* (Nikaidou y col., 1993) o pueden no ser identificadas como en los cuatro genes de *F. solani* f. sp. *pisi* (Guo y col., 1996).

Una situación similar de polimorfismo ha sido descrita para las poligalacturonasas. Existen ejemplos de polimorfismo debidos tanto a la presencia de varios genes como a modificaciones postraduccionales. En *Aspergillus niger* y *Sclerotinia sclerotiorum*, aparecen diferentes isoenzimas de endopoligalacturonasa codificadas por diferentes genes (Bussink y col., 1992; Fraissinet-Tachet y col., 1995), y en *F. moniliforme* aparecen cuatro formas de una endopoligalacturonasa, que derivan del producto de un único gen por modificaciones postraduccionales. En este caso, se han obtenido evidencias de que las cuatro isoformas detectadas en cultivo, derivarían de un único producto génico con diferente patrón de glicosilación (Caprari y col., 1993a).

La regulación es similar a la observada para las liasas: en la mayoría de los casos inducción por pectinas y represión por glucosa. Existen indicios de expresión exclusivamente en planta de algunas de ellas (Fraissinet-Tachet y col., 1995).

Las secuencias deducidas de aminoácidos están más conservadas que para las liasas. El producto de uno de los genes de *S. sclerotiorum* y uno de *A. niger* muestra una identidad del 41,5 al 59,8 % y del 60 %, respectivamente, cuando se comparan con los de otros hongos (Reymond y col., 1994; Bussink y col., 1992).

Existe un motivo específico para las poligalacturonasas fúngicas, CXGGHGXSIGSVG (donde X es siempre un residuo hidrofóbico). Este se reduce a GHGX SXGS, cuando la comparación se hace con plantas superiores y bacterias (Reymond y col., 1994). Algunos análisis han permitido identificar residuos relevantes en relación al centro catalítico, como el residuo de histidina, que es

crítico para la actividad enzimática y la capacidad de macerar (Caprari y col., 1996).

El objetivo de este capítulo ha sido obtener sondas para las enzimas pécticas, liasas e hidrolasas para, a continuación, estudiar su análisis genético en *Fusarium*: grado de similitud con otras secuencias, regulación génica, y determinación del número de copias.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MATERIAL**

El material empleado para la extracción de RNA fue micelio de FORL, aislamiento r2, obtenido a partir de cultivos crecidos: 36 horas en glucosa al 0,5 % ó 72 horas en glucosa al 0,5 %, 24 h en glucosa restrictiva y 6, 48 ó 60 horas en ácido galacturónico restrictivo, pH 5,5. Las condiciones de cultivo aparecen detalladas en el capítulo 3.

El material empleado para la extracción de DNA fue FORL aislamientos r2 y r13 y FOL.

### **EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

#### **Extracción de DNA genómico**

El DNA fue extraído por el método descrito por Dellaporta y colaboradores (1983), con modificaciones. El material congelado a -80 °C (1-1,5 g) fue triturado en mortero con nitrógeno líquido hasta que se formó un polvo fino. Este polvo fue transferido a un tubo de 50 ml con 15 ml de tampón de extracción (Tris 0,1 M, EDTA 0,05 M y NaCl 0,5 M, a pH 8,0), 10,5 µl de β-mercaptoetanol y 1 ml de SDS al 20 %. Fue homogeneizado en un vortex e incubado a 65 °C durante 10 min. A continuación, fueron añadidos 5 ml de acetato potásico 5 M y la mezcla fue incubada 20 min, a 0 °C. El sobrenadante; obtenido después de la centrifugación (20 min a 25.000 g), fue filtrado a través de una gasa a un tubo nuevo, en el que había 10 ml de isopropanol frío, e incubado a -20 °C durante 30 min. Fue centrifugado a 20.000 g durante 15 min y eliminado el sobrenadante, el



precipitado fue resuspendido en 700  $\mu\text{l}$  de tampón TE (Tris 50 mM y EDTA 10 mM, a pH 8,0). Después de transferido a tubos eppendorf, fue centrifugado a 20.000 g durante 10 min y recogido el sobrenadante en un tubo limpio. Este sobrenadante fue precipitado a temperatura ambiente con 75  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol. El precipitado recogido después de la centrifugación, fue lavado con etanol al 70 % y resuspendido en 300  $\mu\text{l}$  de agua. El RNA fue eliminado haciendo una digestión con 10  $\mu\text{l}$  de RNasa (A+T1) por cada 100  $\mu\text{l}$  de solución de DNA a 37 °C durante 1 h. A continuación, el DNA fue fenolizado con una solución de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1), centrifugado y la fase acuosa lavada con cloroformo antes de la precipitación con acetato sódico 3 M pH 5,2 (1/10 vol) y 2,5 vol de etanol al 100 % durante una noche a -20 °C ó 1 h a -80 °C. El precipitado, recogido después de la centrifugación, fue lavado con etanol al 70 % y resuspendido en agua, de esta forma fue guardado a -20°C.

La concentración de DNA fue estimada por absorción a 260 nm, asumiendo que una concentración de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  da una unidad de densidad óptica. La integridad del DNA fue comprobada en geles de agarosa según se describe mas adelante.

### **Extracción de DNA plasmídico**

Las bacterias, crecidas en medio LBA (bacto-triptona 1 %, extracto de bacto-levadura 0,5 %, NaCl 1 % y ampicilina 5 %) en un agitador orbital a 37 °C y 250 rpm durante una noche, fueron centrifugadas durante 30 seg a 20.000 g. El precipitado fue resuspendido en 300  $\mu\text{l}$  de TENS (para 10 ml: 9,5 ml de TE 10:1, 250  $\mu\text{l}$  de SDS al 20 % y 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 10 N) y 150  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 3 M pH 5,2. Entre cada paso, fue agitado con vortex y al final centrifugado 10 min a 20.000 g. El sobrenadante fue precipitado con etanol al 100 % y después de una centrifugación, lavado con etanol al 70 % y resuspendido en agua.

Para extracción en gran cantidad, las bacterias crecieron en 50 ml de medio LBA, a 37 °C y 250 rpm, en un agitador orbital durante una noche. Las bacterias fueron recogidas del precipitado obtenido en sucesivas centrifugaciones de 10 ml de suspensión, a 4000 rpm durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en 200 µl de una solución de glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA 25 mM a pH 8 y transferido a un tubo eppendorf, donde las células se lisaron con 400 µl de una solución de NaOH 0,2 N y SDS 1%. Las células lisadas fueron precipitadas con 300 µl de una solución de acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 5 M, a 0 °C. El sobrenadante obtenido después de una centrifugación a 12000 g durante 5 min a 4 °C, fue fenolizado con un volumen de una solución de fenol-cloroformo. El DNA fue precipitado con un volumen de isopropanol, a temperatura ambiente, durante 5 min. El precipitado recogido después de la centrifugación, fue lavado con etanol al 70 % y resuspendido en 50 µl de agua.

### **Extracción de RNA**

El RNA total fue extraído a partir de micelio según el método fenol/SDS descrito en el capítulo 4

## **ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Las electroforesis tanto de DNA como de RNA fueron realizadas en geles horizontales sumergidos, según está descrito por Sambrook y colaboradores (1989).

### **Electroforesis de DNA**

Fueron utilizados geles de agarosa al 0,8 % (para DNA genómico y

Fueron utilizados geles de agarosa al 0,8 % (para DNA genómico y plasmídico) o al 1 ó 1,5 % (para productos de PCR) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM a pH 8,0) y bromuro de etidio ( $1 \mu\text{gml}^{-1}$ ). Las muestras fueron disueltas en el tampón de carga (glicerol 50 %, EDTA 1 mM y azul de bromofenol 0,25 %). El gel se corrió con tampón TAE a voltaje constante: el DNA plasmídico y los productos de amplificaciones entre 70 y 100 V y el DNA genómico a 30 V.

Como marcador fue usado DNA del fago lamda cortado con la enzima de restricción Pst I y el marcador escalera de Gibco.

### **Electroforesis de RNA**

Los geles de agarosa al 1,5 % en formaldehído 2,2 M, se corrieron en tampón 1x (el tampón 5x contenía ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico 0,1 M, acetato sódico 40 mM y EDTA 5 mM). Todas las soluciones acuosas fueron tratadas con dietil pirocarbonato y esterilizadas por filtración.

Al RNA disuelto en 4,5  $\mu\text{l}$  de agua se le añadió 2,0  $\mu\text{l}$  de tampón de corrida 5x, 3,5  $\mu\text{l}$  de formaldehido y 10,0  $\mu\text{l}$  de formamida. Fue incubado a 65 °C durante 15 min y enfriado en hielo. A continuación, fueron añadidos 2  $\mu\text{l}$  de tampón de la muestra (glicerol 50 %, EDTA 1 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25 % y cianol xilano 0,25 %) y cuando el gel no iba a ser transferido, 1  $\mu\text{g}$  de bromuro de etidio.

El gel se precorrió 5 min a 35 V antes de cargar las muestras y, a continuación, se corrió a voltaje constante, 50 V.

Transcriptos de RNA de 9488-366 nt (USB) fueron usados como marcadores de peso molecular.

## TRANSFERENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### **Transferencia de DNA**

La transferencia fue realizada según Sambrook y colaboradores (1989). Para ello el gel fue incubado en solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) y después en solución neutralizante (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,2 y EDTA 1 mM) durante 30 min cada una, en agitación. La transferencia se realizó por capilaridad a membranas de nylon (Hybond N, de Amersham), con una solución 20xSSC (NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M a pH 7,0) durante una noche, según las instrucciones del fabricante. Todos los pasos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. Antes de fijar el DNA a la membrana a 80 °C durante 2 h, la membrana fue lavada en 2xSSC y secada al aire durante 30 min.

### **Transferencia de RNA**

La transferencia fue realizada según Sambrook y colaboradores (1989). El gel fue lavado durante 10 min con agua y, a continuación, fue transferido a una membrana de nylon cargada (Hybond N<sup>+</sup>, de Amersham), según las instrucciones del fabricante y de la misma forma descrita para el DNA.

## OBTENCIÓN DE SONDAS ESPECIFICAS

### **Poligalacturonasa**

La sonda específica para PG fue obtenida a partir de amplificaciones con cebadores específicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un termociclador (Peltier PTC-100, M. J. Research Inc.). El programa

utilizado para la amplificación de un fragmento de poligalacturonasa consistía en: 5 min a 94 °C; 29 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 2 min a 72 °C; 5 min a 72 °C; y parada en 4 °C.

Para la amplificación fue utilizada Taq polimerasa (Promega), según instrucciones del fabricante, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada nucleótido, 1 μM de cada oligonucleótido usado como cebador y 500 ng de DNA en un volumen final de 30 μl. Los cebadores usados fueron 5'-ATCTGGCCATGTCATTGAT-3' y 5'-GGTCGGCTTTCCCAGTAGG-3', basados en las secuencias conservadas de diversas poligalacturonasas (Crapari y col., 1993b). Estos fueron construidos en la Unidad de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid.

El producto de la amplificación se corrió en gel de agarosa y la banda del producto obtenido, 740 pb de longitud, fue cortada y extraída utilizando el kit USBioclean (Amersham Life Science) según las instrucciones adjuntas.

El DNA purificado fue clonado en el plásmido TA Cloning (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ligamiento se realizó durante una noche a 16 °C. A continuación, la mezcla de ligamiento fue transformada; para ello fue incubada con células competentes de *E. coli* a 0 °C durante 20 min. Después de un choque térmico (2 min a 37 °C y 1 min a 0 °C), crecieron en 800 μl de medio LB (bacto-triptona 1%, extracto de bacto-levadura 0,5% y NaCl 1%), en un agitador orbital a 37 °C y 225 rpm, durante 1 h. La selección de colonias fue realizada creciendo las células a 37 °C durante una noche en placas de LBA (LB mas ampicilina, 50 mg/ml) con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido e isopropil-tio-β-D-galactosido.

Las colonias blancas crecieron en 1,5 ml de LBA una noche a 37 °C y 250 rpm para extraer el DNA plasmídico.

Una vez extraído el DNA plasmídico, fue realizada una comprobación de qué plásmidos tenían el inserto deseado. Para ello, una parte fue digerida con Eco RI (1 unidad por reacción) y RNasa A+T1 en el tampón indicado por el fabricante (Amersham Life Science) a 37 °C y, cargada en gel.

## Liasas

En el caso de la pectato liasa se intentó obtener una sonda específica con los cebadores 5'-TTCCTTCCCCACTGCCGT-3' y 5'-AGGTGTCGCCGTAGTTGG-3' (cebadores denominados cPL1) ó 5'-GTGCTTCCCAGGCCGAG-3' y 5'-GCCGCAGAGGACACCGCC-3' (cebadores denominados cPL2), basados en la secuencia del gen *peIA* de *Fusarium solani* (González-Candelas y Kolattukudy, 1992). El programa utilizado para la amplificación consistía en 5 min a 94 °C; 34 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a diferentes temperaturas (52-62 °C) y 2 min a 72 °C; 5 min a 72 °C; y parada en 4 °C.

El producto fue corrido en gel de agarosa; las bandas de longitud similar a la esperada, 400 pb, fueron cortadas y extraídas utilizando el kit USBioclean (Amersham Life Science) según las instrucciones.

El DNA purificado fue clonado en el plásmido pMOSBlue T-vector y después del ligamiento, durante una noche a 16 °C, fue transformado. Todo ello fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Life Science). El DNA plasmídico fue extraído como ya se ha indicado.

Una vez extraído el DNA plasmídico, para comprobar qué plásmidos tenían el inserto deseado, una parte fue digerida con Eco RI, Hind III y RNasa A+T1 en tampón KGB (glutamato potásico 100 mM, Tris-acetato 25 mM, acetato de magnesio 10 mM, albúmina de suero bovino 50 µg/ml y β-mercapatoetanol 0,5 mM) a 37 °C y, a continuación, cargada en gel.

Alternativamente, como sonda para las liasas, fue utilizado un fragmento obtenido a partir del plásmido pPLg2 proporcionado amablemente por el Dr. Kolattukudy del Ohio State Biotechnology Center (The Ohio State University, Columbus). Éste contenía la secuencia completa del gen *peIA* de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Gonzalez-Candelas y Kolattukudy, 1992). Para la obtención del fragmento fue amplificado el plásmido pPLg2, usando como cebadores los cPL2.

## HIBRIDACIONES

### **Marcaje radioactivo de sondas**

*Marcaje de la sonda.* 25 ng de sonda fueron marcados por "random priming" con el sistema *rediprime* (Amersham Life Science) con  $^{32}\text{P}$ -dCTP (actividad específica de  $3000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ), a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min.

*Prehibridación.* Los filtros fueron prehibridados durante una noche a  $40^\circ\text{C}$ , en una solución de formamida 50 %, SSPE 5 % (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM y EDTA 5 mM, a pH 7,7), Denhardt 5 % (Ficoll 0,02 %, polivinilpirrolidona 0,02 % y albúmina de suero bovino 0,02 %), SDS 0,5 % y  $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de esperma de salmón desnaturalizado.

*Hibridación.* La solución de prehibridación fue sustituida por otra idéntica que contiene además la sonda de DNA marcada desnaturalizada. La hibridación fue llevada a cabo durante 24 horas a  $40^\circ\text{C}$ .

*Lavados.* Después de la hibridación fueron realizados dos lavados de 15 min en SSPE 2x y SDS 0,1 %, a temperatura ambiente, y un lavados de 15 min a distintas temperaturas en SSPE 1x y SDS 0,1 %.

*Detección.* La exposición del filtro se llevó a cabo a  $-80^\circ\text{C}$  en oscuridad con una película Kodak X-OMAT-AR.

### **Marcaje con digoxigenina-11-dUTP**

*Marcaje de la sonda.* El marcaje fue realizado por amplificación por PCR con el kit "PCR DIG labeling mix" (Boehringer) del plásmido que tenía el inserto

con los cebadores correspondientes o por "random priming" (Boehringer kit) según las instrucciones del fabricante. El producto fue precipitado con 2,5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol durante 30 min a -80 °C o durante una noche a -20 °C. A continuación fue lavado con etanol al 100 % y al 70 %, secado y resuspendido en agua.

*Prehibridación.* Los filtros fueron prehibridados durante 6 horas a temperaturas de 58 ó 65 °C, en una solución de 5x SSC, N-lauroylsarcosina (sal sódica) 0,1 %, SDS 0.02 % y reactivo bloqueante 1 %.

*Hibridación.* La solución de prehibridación fue sustituida por otra idéntica que contiene además la sonda de DNA marcada desnaturalizada. La hibridación fue llevada a cabo durante una noche a la misma temperatura.

*Lavados.* Después de la hibridación fueron realizados dos lavados de 5 min en 2x SSC y SDS 0,1 %, a temperatura ambiente, y dos lavados de 5 min en 0,1x SSC y SDS 0,1 %, a 65°C.

*Detección.* Fueron realizados los siguientes pasos a temperatura ambiente:

- Lavado del filtro durante 1 min con Tris-HCl 100 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5.
- Incubación durante 30 min en el mismo tampón con 0,5 % (w/v) de reactivo bloqueante (Boehringer Mannheim).
- Lavado del filtro con Tris-HCl 100 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5.
- Incubación de 30 min en la misma solución con el anticuerpo-conjugado anti-dioxigenin-AP (150 mU.ml<sup>-1</sup>) (Boehringer Mannheim).
- Dos lavados de 15 min con Tris-HCl 100 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5.
- Equilibrado de la membrana con Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9,5, durante 2 min.



- Incubación del filtro en oscuridad en 2,25  $\mu\text{l}$  de solución de nitroblue tetrazolium salt (75  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  en 70 % (v/v) dimetilformamida) y 1,75  $\mu\text{l}$  de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) por cada ml de tampón Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  50 mM.
- Paro con agua.

## TRANSCRIPCIÓN INVERSA

La transcripción inversa fue realizada a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA en mezclas de reacción que contenían  $\text{MgCl}_2$  5 mM, 250  $\mu\text{M}$  de cada nucleótido, inhibidor de RNasa 0,5  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , transcriptasa reversa 1,5  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  y oligod(T)<sub>16</sub> 1,25  $\mu\text{M}$  en el tampón indicado por la casa comercial (Perkin-Elmer), en un volumen de 30  $\mu\text{l}$ . La reacción consistía en 20 min a 42 °C, 5 min a 99 °C y parada a 5 °C.

Para la amplificación posterior fueron usados 4,5  $\mu\text{l}$  del producto de la reacción anterior, en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$ . La *ampliTaq* Polimerasa (Perkin-Elmer) fue utilizada según instrucciones del fabricante, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de cada nucleótido y 1  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido usado como cebador (descritos en el apartado de obtención de sondas específicas).

Como blanco fue utilizado una mezcla de reacción sin muestra de RNA. Así mismo, fueron realizados controles negativos con amplificaciones sobre muestras de RNA, digeridas con RNasa o no, para detectar falsos positivos debidos a la presencia de DNA genómico residual.

## SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Colonias con inserto del gen de PG o PL fueron secuenciadas en las dos direcciones para comprobar que la secuencia era un fragmento del gen deseado.

El DNA plasmídico fue previamente purificado usando columnas Quiagen tip 20 según las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por la Unidad de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid.

Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con las presentes en los bancos que utiliza el programa BLASTX (Genbank, EMBL, DDBJ, PDB).

## RESULTADOS

### POLIGALACTURONASA

#### Obtención de una sonda para la PG

La amplificación de DNA del aislamiento r2 de FORL dio un único fragmento de 740 pb, tamaño semejante al obtenido teniendo en cuenta las secuencias de otras poligalacturonasas (Caprari y col 1993b). Después de clonar este fragmento y secuenciarlo se comprobó, con los bancos que utiliza el programa BLASTX, que se trataba de una poligalacturonasa. La secuencia de nucleótidos de este fragmento presentaba una homología elevada con la de *F. moniliforme*. La secuencia aparece en la figura 5.1 y en ella se señalan los presuntos intrones y la secuencia de aminoácidos correspondiente. Tres posibles puntos de glicosilación han sido identificados en la misma posición que en *F. moniliforme* (Caprari y col., 1993b).

La posición de los intrones es la misma que la de los intrones III y IV de *F. moniliforme* (Caprari y col., 1993b). Las secuencias de ruptura del extremo 5' no se ajustan perfectamente a la secuencia descrita, GTANGT. En el primer intrón, el penúltimo nucleótido es una T y en el segundo, el último es una C. En cuanto al extremo 3', el segundo intrón sí se ajusta a la secuencia consenso (T/C)AG, mientras que el primero tiene AAG. La longitud de los intrones, 49 y 59 bases, está dentro de la encontrada generalmente en hongos filamentosos (49-85).

Se ha encontrado el motivo específico para las poligalacturonasas fúngicas, CXGGHGXSIGSVG, aunque con una modificación, el cuarto aminoácido aparece una C.

TCTGGCCATGTCATTGATGGTAACGGCCCCGGCGTACTGGGATGGCGAAGGTTCTAACAAĊ	60
S G H V I D G N G P A Y W D G E G S N N	20
AAGGACAACĊCAAAGtattttccccacgacĊctggtgcaacagaggatataĊtgacttacā	120
K D N P K	25
aagGCCCCGACĊCATTTCATCGĊTTGTCAAGAĊGACTACTGGĊAACTCAAAGĊTCACAAACĊT	180
P D H F I V V K K T T G N S K I T N L	44
AAACATCCGĊAATTGGCCTGĊTTCACTGCTĊTCGACATCACĊAGGCAGTTCĊAĊAATTGACCAĊT	240
N I Q N W P V H C F D I T G S S Q L T I	64
CTCAGGGCTĊATTCTTGATAĊACAGACTTGGĊCGACAAGCCĊAATGCCAAGĊGCGGTAGCTĊT	300
S G L I L D N R L G D K P N A K S G S L	84
GCCCGCTGCGĊCACAACAGCGĊACGGTTTTCGĊACATCTCGTĊCĊAGTGACCACĊGTTACTCTGGĊ	360
P A A H N S D G F D I S S S D H V T L D	104
TAAcATTcATgTTTATAACĊAGGATGACTĊGTGTGCTGTĊACTTCGGGTĊCAAACATTĊTĊ	420
N I H V Y N Q D D C V A V T S G T N I I	124
CGTCTCCAĊATGTACTGCTĊCCGGTTGTCĊATGGTCTTAGĊATCGGATCTĊGTCGGTGGCAĊ	480
V S N M Y C S G C H G L S I G S V G G K	144
GAGCAACAĊTGTGTCĊAATĊGGTGTTCAGTĊTCTGGATTcĊGAGATTGTTĊACAGTGAGĊ	540
S N N V V N G V Q F L D S Q I V N S E N	164
TGGATGCCGĊATCAAGTCCĊAACTCTGGCAĊAACTGGCACĊGgtaagcaaĊacccaacĊcā	600
G C R I K S N S G T T G T	177
accatcacĊgtgcattctcĊggaactaactĊgtgtattagĊATTGCGAACĊGTCACTTACCAĊ	660
I A N V T Y Q	184
AACATTTCĊĊTTACCAACĊATCAGCAAGTAĊGGTGTGCGATĊGTCCAGCAGGĊACTATCTCAĊĊ	720
N I S L T N I S K Y G V D V Q Q D Y L N	204
* * *	
GGCGGCCĊTĊACGGAAAGĊCĊGACC	744
G G P Y G K P T	312

**Figura 5.1.** Secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por amplificación de DNA genómico de FORL aislamiento r2 con los cebadores 5'-ATCTGGCCATGTCATTGAT-3' y 5'-GGTGGCTTTCCCAGTAGG-3'. La secuencia de aminoácidos obtenida con el programa Genepro aparece debajo, en ella se marca con negrilla la secuencia consenso de poligalacturonasas y con asterisco los posibles puntos de N-glicosilación. Los posibles intrones aparecen en letra minúscula.

### **Regulación transcripcional**

La regulación a este nivel ha sido estudiada mediante Northern blot. Para ello se realizaron hibridaciones, a 40 °C, de membranas en las que había RNA obtenido de micelio crecido durante 36 horas en glucosa y, micelio crecido durante 6, 48 y 60 horas en ácido galacturónico. El fragmento de 740 pb, marcado con <sup>32</sup>P, fue utilizado como sonda (figura 5.2). En la muestra procedente de 36 horas en glucosa al 0,5 % no se detectó ninguna banda, mientras que en las demás (6, 48 y 60 horas en ácido galacturónico) sí se detectó una banda de aproximadamente 1400 bases. En el último tiempo, la cantidad de mRNA para PG es muy superior a la de los tiempos anteriores.

El filtro de RNA utilizado fue hibridado con una sonda de DNA codificadora de RNA ribosómico (pRE12). En todas las muestras fue detectada una banda de igual intensidad (figura 5.3), por lo que la cantidad de RNA cargado había sido la misma.

Para comprobar si había mRNA en ausencia de inductor, aunque fuera a muy bajos niveles, fueron realizadas transcripciones inversas a partir de las muestras anteriores (RNA obtenido de micelio crecido durante 36 horas en glucosa y micelio crecido durante 6, 48 y 60 horas en ácido galacturónico). El producto de estas transcripciones fue después amplificado con los cebadores específicos para PG. En todos los casos fue detectada una banda de longitud similar a la esperada para amplificaciones de DNA genómico (figura 5.4A). La membrana obtenida por transferencia de estas muestras fue hibridada con la sonda de poligalacturonasa marcada con digoxigenina-11-dUTP por "random priming", a 68 °C. En todos los casos la sonda hibridabó con las bandas obtenidas (figura 5.4B).

Los RNA utilizados en la transcripción inversa fueron amplificados también con los mismos cebadores para ver posibles contaminaciones de DNA, como se indica en Materiales y Métodos, pero en ningún caso apareció banda.

## PECTATO LIASA

### Obtención de la sonda

La amplificación de DNA de FORL r2 con los oligonucleótidos cPL1, a 52 °C, dio por electroforesis varias bandas, entre ellas una de tamaño superior a 500 pb (figura 5.5). El tamaño esperado por la secuencia del gen *pelA* de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* era de 636 pb. Esta banda fue purificada y el fragmento correspondiente clonado. Su secuencia no presentó ninguna homología con las liasas pécticas presentes en los bancos de datos que utiliza el BLASTX.

Las amplificaciones a distintas temperaturas (52, 55, 57, 60 y 62 °C) con los oligonucleótidos cPL2 como cebadores, mostraron por electroforesis varias bandas, algunas de tamaño similar a la esperada, 406 pb (figura 5.6A). El gel de agarosa con las muestras de amplificaciones a distintas temperaturas fue transferido a una membrana. Este filtró fue hibridado a 65 °C (condiciones restrictivas) con la sonda obtenida por amplificación del plásmido pPLg2 con estos oligonucleótidos, marcada con digoxigenina-11-dUTP. La hibridación dio una banda positiva en la zona de 400 pb (figura 5.6B). Las dos bandas que aparecían a esta altura fueron clonadas y secuenciadas. Las colonias obtenidas fueron hibridadas también con esta sonda y no dieron señal o ésta fue débil. Varias de estas últimas fueron secuenciadas y en ningún caso la secuencia mostró similitud con otras secuencias de PL presentes en los bancos de datos que utiliza el programa BLASTX.

Para ver la eficacia de la amplificación con los segundos cebadores utilizados, cPL2, y como control positivo, fue amplificado DNA genómico de un *F. solani* aislado de pinos. Apareció un fragmento del tamaño igual al esperado, 406 pb (figura 5.7A). Esta banda hibridó con la sonda obtenida a partir del fragmento amplificado del plásmido pPLg2 con estos cebadores, marcada radiactivamente (figura 5.7B).

**Figura 5.2.** Hibridaciones tipo Northern de RNA obtenido de micelio crecido durante 36 horas en glucosa (calle 1) y, micelio crecido durante 6 (calle 2), 48 (calle 3) y 60 (calle 4) horas en ácido galacturónico restrictivo. (A) Hibridación con la sonda de PG marcada con  $^{32}\text{P}$  a 40 °C. (B) Hibridación con la sonda pRE12 marcada con  $^{32}\text{P}$  a 42 °C.

**Figura 5.3.** (A) Gel de agarosa de transcripción inversa y posterior amplificación con los cebadores específicos para PG a partir de muestras de micelio crecido durante 36 horas en glucosa (calle 1) y, micelio crecido durante 6 (calle 2), 48 (calle 3) y 60 (calle 4) horas en ácido galacturónico restrictivo. (B) Hibridación a 68 °C con la sonda de PG marcada con digoxigenina-11-dUTP por "random priming".

**Figura 5.4.** Gel de agarosa con los productos obtenidos por amplificación de DNA genómico del aislamiento r2 de FORL con los cebadores cPL1 a 52 °C (A) y DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción Pst I usado como marcador (M).

**Figura 5.5.** (A) Gel de agarosa con los productos de las amplificaciones de DNA genómico del aislamiento r2 de FORL con los cebadores cPL2 a distintas temperaturas (52, 55, 57, 60 y 62 °C) y marcador escalera de Gibco (M). (B) Hibridación a 65 °C de la membrana, obtenida por transferencia de estas muestras, con la sonda marcada con digoxigenina-11-dUTP por amplificación del plásmido pPLg2 con los cebadores cPL2.

**Figura 5.6.** (A) Gel de agarosa con el producto obtenido por amplificación de DNA genómico de un *F. solani* aislado de pino con los cebadores cPL2. (B) Hibridación con la sonda obtenida a partir del fragmento que resulta de la amplificación de pPLg2 con los cebadores cPL2 marcada radiactivamente.

**Figura 5.7.** (A) Gel de agarosa de transcripción inversa y posterior amplificación con los cebadores cPL2, a partir de muestras de micelio crecido durante 36 horas en glucosa (calle 1) y micelio crecido durante 6 (calle 2), 48 (calle 3) y 60 (calle 4) horas en ácido galacturónico restrictivo. (B) La membrana obtenida por transferencia de estas muestras fue hibridado con la sonda obtenida a partir del fragmento que resulta de la amplificación de pPLg2 con los cebadores cPL2 marcada con digoxigenina-11-dUTP por "random priming".

**Figura 5.8.** Hibridación tipo Southern de DNA genómico de tres *F. oxysporum*, FORL aislamientos r2 y r13 y FOL, digerido con Eco RI (E) y Pst I (P) con la sonda marcada radiactivamente a partir de un fragmento del plásmido pPLg2.

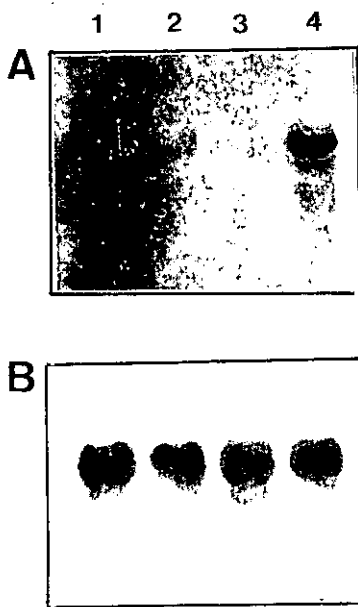


Figura 5.2.

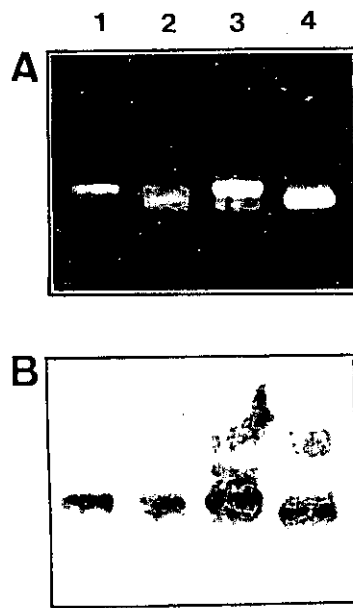


Figura 5.3.

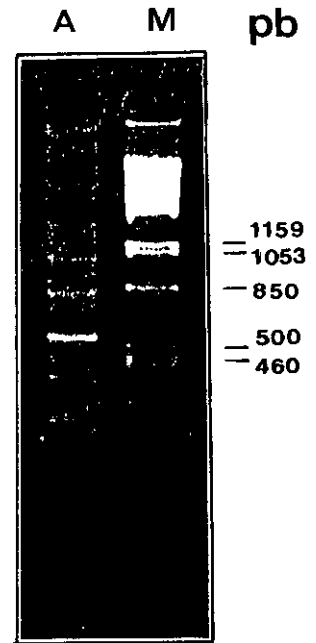


Figura 5.4.

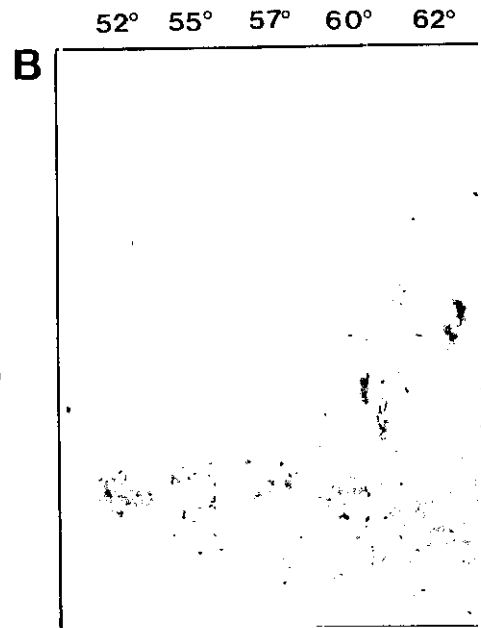
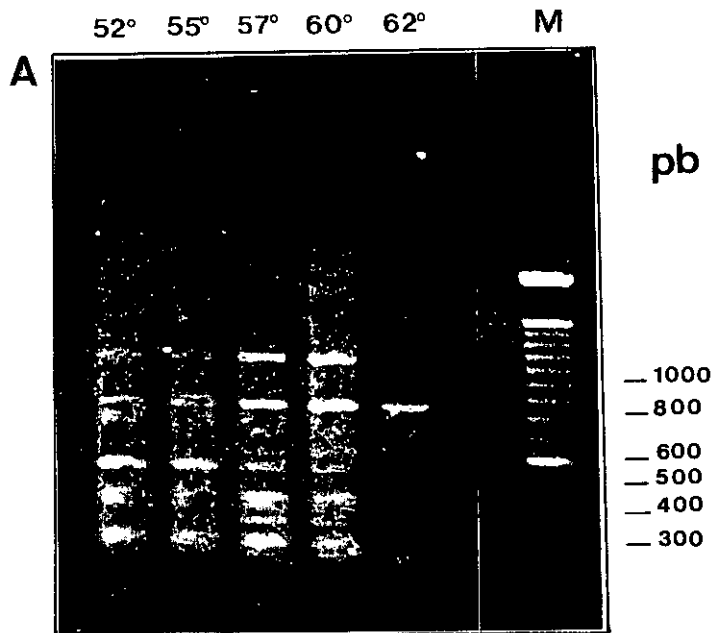


Figura 5.5.





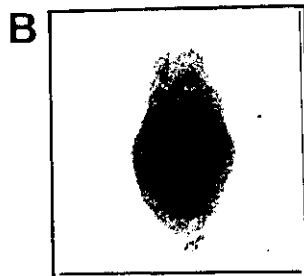
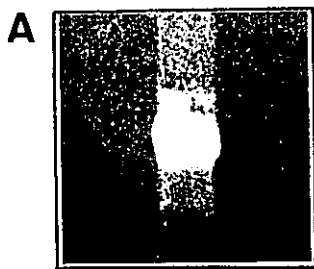


Figura 5.6.

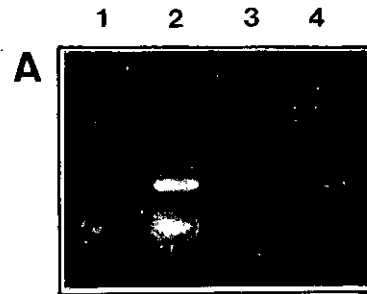


Figura 5.7.

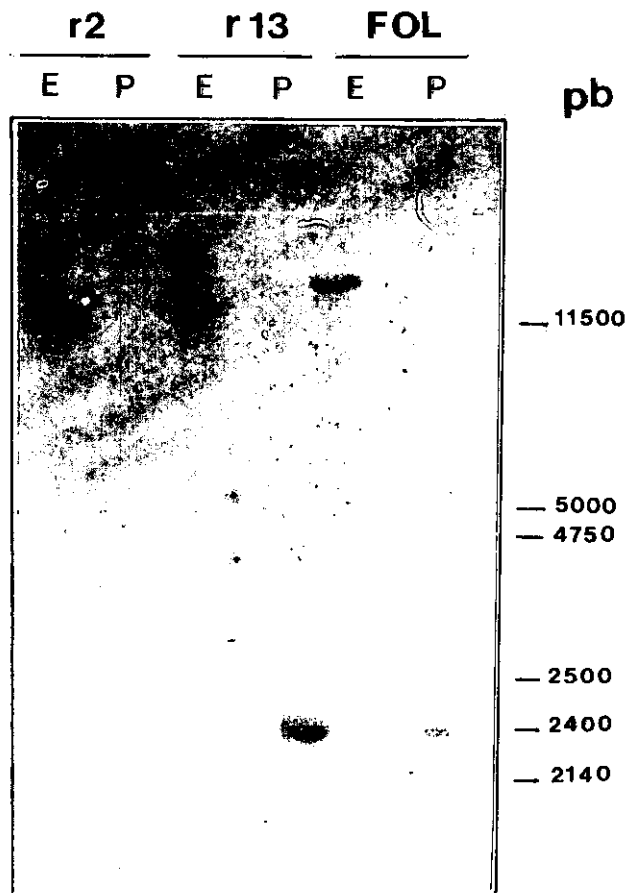


Figura 5.8.



## Regulación

Se probó la sonda obtenida a partir del plásmido pPLg2, para estudiar la regulación y ver la posible obtención de la sonda a través de transcripciones inversas, amplificadas con los cebadores cPL2. Se realizaron transcripciones inversas a partir de RNA obtenido de micelio crecido durante 36 horas en glucosa y micelio crecido durante 6, 48 y 60 horas en ácido galacturónico. El producto de estas transcripciones fue amplificado con los cebadores cPL2. En todos los casos dio una banda de longitud algo inferior a la esperada para amplificaciones de DNA genómico, 400 pb (figura 5.8A). La banda de mayor intensidad aparecía en cultivos de 36 horas en glucosa. La hibridación con la sonda, marcada con digoxigenina-11-dUTP por "random priming", a 58 °C, dio señal en todos los casos pero con muy diferente intensidad (figura 5.8B). La muestra procedente de cultivos de 60 horas en ácido galacturónico dio una señal mucho mayor a pesar de que, aparentemente, no era la banda que mas cantidad tenía (figura 5.8A).

## Hibridación con el DNA genómico

Por último, DNA genómico de *Fusarium oxysporum* fue hibridado con la sonda obtenida a partir del plásmido pPLg2, para ver si había alguna región en el DNA que fuera similar a la secuencia del gen *pelA* de *F. solani*. Para ello DNA de FORL, aislamientos r2 y r13, y FOL fue digerido con Eco RI y Pst I. En los tres hongos se detectó una banda para cada digestión. FORL aislamiento r2 presentaba una banda de 11.715 pb cuando se cortaba con Eco RI y una de 2.397 pb cuando se cortaba con Pst I, en r13 se detectó una de 11.373 pb y otra de 2.259 pb y en FOL una de 12.431 pb y otra de 2.192 pb respectivamente (figura 5.9), indicando la probable presencia de una secuencia similar en ambas formas especiales.

## DISCUSIÓN

La obtención de una única banda en las amplificaciones del DNA genómico con cebadores para PG, basados en las secuencias conservadas de diversas poligalacturonasas (Crapari y col., 1993b), demuestra la idoneidad de estos cebadores para amplificar secuencias de PG en especies y estirpes relacionadas. La secuencia del fragmento obtenida también presenta elevada homología cuando se compara con secuencias de otros organismos (Patiño y col., en preparación).

El estudio de la regulación genética ha puesto de manifiesto una regulación a nivel transcripcional de, al menos, una poligalacturonasa. Para poder cuantificar las posibles diferencias entre los cultivos, ha sido realizada una hibridación de los RNA con el fragmento obtenido a partir de la amplificación del DNA genómico. En la muestra procedente de 36 horas en glucosa, no fue detectada ninguna banda mientras que en las otras tres muestras, procedentes de cultivos que habían estado en presencia de ácido galacturónico, sí fue detectada una banda de aproximadamente 1400 bases. El tamaño es igual al observado para cultivos de r2 y r6 crecidos sobre otra fuente de carbono como la pectina (Patiño y col., en preparación) y similar al obtenido para otros microorganismos como *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig y col., 1990) y *Fusarium moniliforme* (Caprari y col., 1993a). La existencia de una única banda indicaría la existencia de un único mensajero que da lugar a distintas formas por modificaciones postraduccionales o puede que no reconozca a otros mensajeros codificados por otros genes. Los resultados del Southern blot de DNA genómico de r2 y r13 parecen indicar la presencia de un gen de copia única, aunque no se descarta la posibilidad de la existencia de otros genes, en los que su similitud en la zona de hibridación no sea elevada, que codifiquen para otros mensajeros (Patiño y col., en preparación).

El análisis de la transcripción inversa permite un estudio cualitativo más

sensible: en primer lugar se van a transcribir a cDNA todos los mensajeros y en segundo lugar la técnica de amplificación va a proporcionar un número muy alto de copias de los fragmentos a los que los cebadores se unen por su especificidad. Esto permite detectar niveles muy bajos de mRNA. En todas las muestras estudiadas, procedentes de micelio crecido durante 36 horas en glucosa y micelio crecido durante 6, 48 y 60 horas en ácido galacturónico, se detectó banda; en todos ellos había mRNA que codifica para poligalacturonasa.

El hecho de que por transcripción inversa y amplificación de RNA obtenido de cultivos de 36 horas en glucosa, sí se detecte banda, pone de relieve la existencia de mRNA para PG en estas condiciones. No obstante, los niveles son tan bajos que no son detectados con las hibridaciones tipo Northern. Cuando el ácido galacturónico está presente en el medio, aumenta la cantidad de mRNA para PG. Se confirma con esto lo ya expresado en los capítulos 3 y 4: el ácido galacturónico actúa como inductor a nivel transcripcional. En su ausencia no se detecta actividad porque los niveles de proteína traducida deben ser insuficientes para su detección por el método usado. En presencia de ácido galacturónico, los niveles de actividad aumentan desde las 6 horas, lo que va acompañado de un aumento en los niveles de mRNA, también desde las 6 horas.

La elección de los cebadores para la PL presentaba más dificultad. Ya se ha comentado que las secuencias descritas para las liasas pécticas presentan poca homología. Las secuencias de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* han sido las únicas descritas para el género. Éstas presentan aun menor homología con el resto e, incluso dentro de este organismo, se han descrito genes de liasas con un 65 ó 51 % de homología entre ellos (Guo y col., 1995a, b). Una dificultad adicional radicaba en la probable poca semejanza entre *Fusarium solani* y FORL. Un indicio de ello es la escasa homología que existe en el gen de PG entre ambos organismos (Posada y col., 1996)

No obstante, *Fusarium oxysporum* es un hongo del mismo género que *F. solani*, y parece más razonable que se asemeje más a éste que a otros géneros de

hongos o bacterias, en los que han sido descritos genes de liasas. Es por esto, por lo que fueron utilizados cebadores basados en la secuencia de uno de sus genes que codifica para PL y además, fue utilizado, como sonda, un fragmento de éste.

En primer lugar fueron elegidos cebadores basados en la secuencia del gen *peIA* de *F. solani* f. sp. *pisi* (Gonzalez-Candelas y Kolattukudy, 1992), sin tener en cuenta posibles homologías con otras secuencias; éstos se perfilaban como buenos cebadores por sus propiedades. La amplificación de DNA del aislamiento r2 de FORL con estos oligonucleótidos (cPL1) dio varias bandas entre ellas una de tamaño similar al esperado por la secuencia del gen de *Fusarium solani*. El análisis de la secuencia de este fragmento descartó la idea de una posible liasa. A continuación fueron elegidos unos oligonucleótidos (cPL2) que correspondían a zonas conservadas. Las amplificaciones a distintas temperaturas mostraron varias bandas, algunas de tamaño similar a la esperada (400 pb), que además daban señal cuando se hibridaba con una sonda obtenida a partir de la amplificación del plásmido pPLg2 con los mismos cebadores. Dos de estas secuencias fueron secuenciadas, pero tampoco correspondían a fragmentos de liasas.

Los cebadores utilizados (cPL2) fueron eficientes para la amplificación de DNA genómico de un *F. solani* aislado de pino. La dificultad de amplificar un fragmento del gen en FORL era probablemente debido a la poca homología en estas regiones, entre estos organismos. No obstante, ya se ha visto que un estudio de PGs realizado con distintos *Fusarium* ha demostrado que *F. solani* es la especie más diferente dentro del género (Posada y col., 1996). Las secuencias de pectato liasa podrían ser bastante diferentes, aunque recientemente ha sido purificada una pectato liasa de FOL cuya secuencia N-terminal muestra un 100 % de homología con la PLA de *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (Di Prieto y Roncero, 1996c).

Las hibridaciones de los productos obtenidos por amplificaciones de transcripciones inversas con la sonda de *F. solani*, abren una puerta a la posible obtención de una sonda propia o, al menos, a la utilización de la sonda de *F.*

*solani*. En las amplificaciones, la banda de mayor intensidad aparece en cultivos de 36 horas en glucosa (cultivo en ausencia de inductor), pero la hibridación con la sonda obtenida a partir de pPLg2 da mayor señal en la muestra procedente de cultivos de 60 horas en ácido galacturónico (presencia de inductor), situación más en consonancia con el patrón de inducción de actividades. Los oligonucleótidos utilizados deben amplificar otras zonas del DNA y producir una mezcla de fragmentos de tamaño similar al esperado; es por esto por lo que, en presencia de glucosa, aparece una banda de mayor intensidad que la producida por muestras procedentes de 60 h en ácido galacturónico. Sin embargo, cuando se hibrida con la sonda, aparece mayor intensidad en las muestras de 60 h en ácido galacturónico que en las de glucosa; hay más fragmentos procedentes de mRNA de liasas. El ácido galacturónico actúa como inductor a nivel transcripcional: tanto en presencia como en ausencia hay mRNA para PL pero, la adicción del ácido aumentará sus niveles considerablemente. El clonaje de la mezcla de fragmentos obtenidos a las 60 horas en ácido galacturónico proporcionará una mezcla de plásmidos, algunos de los cuales contendrán el fragmento del gen de una liasa.

Ante la posibilidad de utilizar la sonda obtenida a partir del plásmido pPLg2 fue realizada una hibridación del DNA genómico digerido, de dos aislamientos de FORL y del uno FOL para ver posibles homologías entre el gen *peIA* de *F. solani* y alguna región del DNA de *F. oxysporum*. En todos los casos fue detectada una banda para cada digestión. Al menos existe una región en el DNA que presenta similitud con la secuencia de pectato liasa A de *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. Puede que existan otras secuencias para liasas pero estas tendrán poca homología.

Aunque la utilización de la sonda de *F. solani* pueda ser útil para conseguir una sonda específica de FORL, no será suficiente para obtener sondas de todos los posibles genes de liasas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de las enzimas purificadas, permitirán la obtención de cebadores específicos que amplifiquen principalmente las regiones que codifican para estas enzimas.



La obtención de sondas específicas para poligalacturonasas y liasas permitirá realizar estudios de presencia y/o regulación de dichas enzimas *in planta*.

## CAPÍTULO 6.

Purificación y Caracterización de las Liasas de FORL

r2.



## INTRODUCCIÓN

FORL r2 produce varias enzimas pécticas que difieren en preferencia por sustrato, modo de acción y mecanismo de la reacción (capítulo 3). Han sido identificadas tres isoformas con actividad liasa y cuatro isoformas con actividad poligalacturonasa (figura 3.6). De las tres liasas, la mayoritaria es la más alcalina (pI 9,20) y muestra preferencia por pectina, mientras que las otras dos (pIs 9,00 y 8,65) por pectato.

La caracterización de una actividad enzimática puede ser útil para un mejor conocimiento del modo de acción de estas enzimas tanto en cultivo como en planta. La presencia de varias formas en el medio dificulta esta caracterización, es por tanto necesaria la separación de las tres actividades para un mayor conocimiento. A pesar de que estudios *in vitro* nos permiten conocer parte de las propiedades de las enzimas hay que tener en cuenta que en ocasiones se han encontrado diferencias entre las propiedades de las enzimas *in vitro* y en tejidos infectados (Hancock, 1976).

Una primera purificación, mediante precipitación con sulfato amónico (40-100 % de saturación), filtración en gel en una columna Superdex 75HR1030, e isoelectroenfoque preparativo en un rango 7-11, permitió la obtención de una fracción homogénea con la liasa de pI 9,2 (Guevara y col., 1996). Un pico con actividad PNL fue eluido de la columna Superdex 75HR1030 con un volumen de elución que correspondía a un peso molecular de 18 kDa. Un análisis por isoelectroenfoque analítico reveló que, mientras que en extractos precipitados con sulfato amónico se detectaban las tres liasas, en el pico eluido de la columna Superdex sólo se detectaba la liasa mayoritaria en gel réplica para actividad, mientras que en la tinción de plata se observaban otras proteínas más ácidas. Las dos actividades liasas con pIs 9,00 y 8,65 se perdían en el primer paso de purificación. Para eliminar las proteínas ácidas contaminantes fue necesario un

isoelectroenfoque preparativo a partir del cual se obtuvo un pico mayoritario con actividad PNL que eluía a pHs próximos a su pI (entre 9,50 y 9,12). El análisis por isoelectroenfoque analítico reveló la existencia de una única banda tanto por tinción de actividad, como por tinción de proteínas.

Una caracterización de esta enzima purificada confirmó su mayor especificidad por pectina, un modo de acción "endo" y requerimiento de  $\text{CaCl}_2$  (la adición de EDTA a las mezclas de reacción provocó una completa pérdida de actividad, mientras que la adición de  $\text{CaCl}_2$  incrementó la actividad).

Este método de purificación no permitía la obtención de las otras dos actividades liasas. Por otra parte, el rendimiento era muy bajo desde los primeros pasos, 6,3 % después de la precipitación con sulfato amónico. El objetivo de este capítulo ha sido la purificación de las tres liasas para su caracterización, estudio de diferencias entre ellas y posible sinergismo en la acción conjunta.

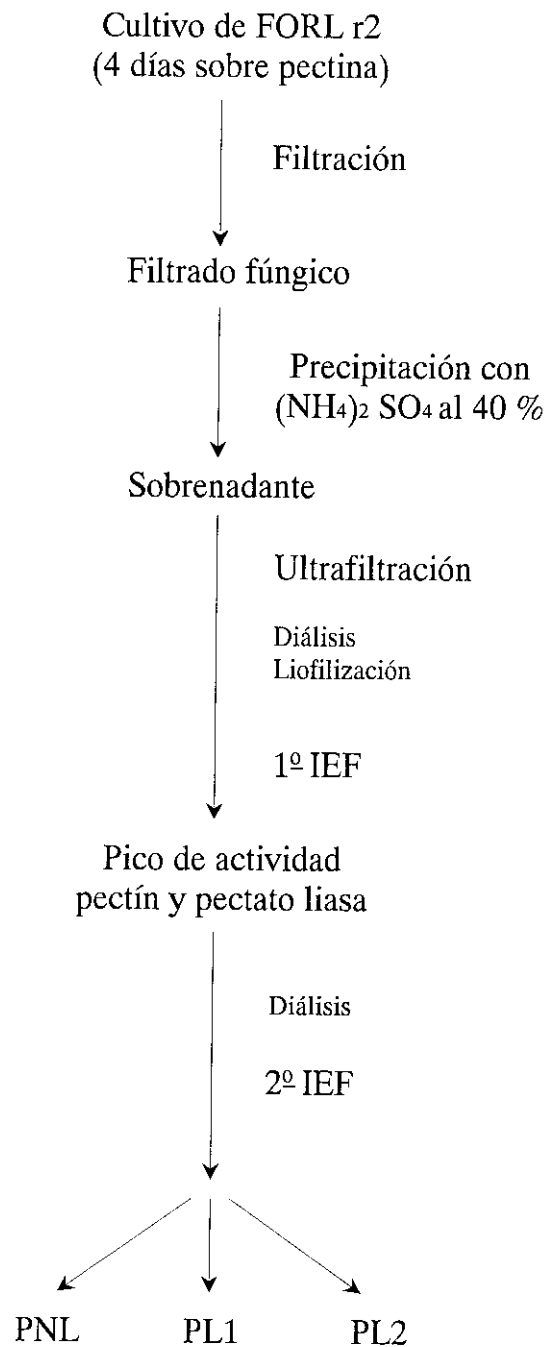
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Purificación

*Obtención del filtrado fúngico.* FORL r2 fue crecido en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio salino en un agitador orbital a 150 rpm y 22 °C, tal como está descrito en el capítulo 2. Los cultivos fueron mantenidos durante tres días en glucosa al 0,5 % (w/v) y, a continuación, 1 ml fue transferido a matraces con 100 ml de medio salino fresco con pectina al 0,5 % (w/v) donde fue mantenido durante cuatro días. El medio fue clarificado mediante filtración de los cultivos a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A). Una pequeña cantidad fue dializada para la determinación de las actividades y de la cantidad de proteínas y el resto fue precipitado.

*Precipitación con sulfato amónico y concentración.* El medio clarificado fue llevado al 40 % de saturación por adición de sulfato amónico a 4 °C, en agitación. Después de varias horas el precipitado fue removido por centrifugación a 30.000 g durante 30 min. El sobrenadante fue concentrado en una célula de ultrafiltración (Amicon), con filtros PM10 (Diaflo). El medio concentrado fue dializado y liofilizado.

*Isoelectroenfoque preparativo.* El medio liofilizado fue resuspendido en agua y cargado en una columna de 110 ml de capacidad (LKB). El gradiente de densidad fue establecido con sorbitol [0-50 % (w/v)]. La muestra fue añadida a las soluciones que formarían el gradiente. Anfolitas Servalyte 7-9 y 9-11 (Serva) fueron usadas, en una concentración del 1,2 % (w/v). El ánodo, colocado en la parte alta de la columna, estaba formado por ácido fosfórico 0,15 M y el cátodo, situado en la parte baja, por hidróxido sódico 0,22 M. El experimento fue llevado a cabo a 7 °C, a potencia constante (9,6 W) y a un voltaje máximo de 1600 V. Después de 48 h, fracciones de 3 ml fueron recogieron por la parte baja de la



**Figura 6.1.** Esquema del proceso de purificación.

columna, y el pH de cada una fue inmediatamente medido. Las fracciones con actividad PNL o PL fueron recogidas y cargadas en un segundo isoelectroenfoque en las mismas condiciones. En este último fueron recogidas fracciones de 0,25 ml.

En la figura 6.1 puede observarse un esquema de los pasos realizados.

### **Medida de la actividad enzimática y proteínas**

Las actividades pectín y pectato liasa fueron medidas determinando la absorbancia a 235 nm del producto 4,5-insaturado de la reacción, a 37 °C, según aparece descrito en el capítulo 2. Las medidas viscosimétricas fueron realizadas usando micro-viscosímetros Ostwald a 37 °C.

La cantidad de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) usando albúmina de suero bovino (Sigma) como patrón.

### **Isoelectroenfoque analítico**

Las proteínas fueron separadas según su punto isoeléctrico en un rango de pH 2-11, con un equipo LKB 2117 Multiphor II a 7 °C. Fueron utilizados geles ultrafinos (0,4 mm) de poliacrilamida que contenían, acrilamida al 5,2 %, bisacrilamida al 0,17 %, 1,1 ml de anfolitas, 0,6 ml de persulfato amónico al 1 % y 20 µl de TEMED, en un volumen total de 12,72 ml. El gel fue preparado sobre un cristal silanizado en una bandeja, Ultro Thin Layer Casting Tray (Bio Rad). Las tiras de los electrodos, que constituían el ánodo y el cátodo, fueron empapadas en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y NaOH 0,5 M, respectivamente.

El preenfoco de las anfolitas se llevó a cabo a 5 W durante 30 min. A continuación, 10 µg de proteínas fueron aplicadas a 1 cm del ánodo, utilizando papel Whatman. El gel fue enfocado a 15 W con un máximo de 1400 V durante 60 min; los aplicadores fueron retirados después de 30 min de enfoque. Para estimar el pI una mezcla de proteínas estandarizada (Broad pI Calibration Kit



standards, Pharmacia) fue utilizada.

Los geles fueron teñidos con plata para la detección de proteínas, con el kit de Bio-Rad, según las instrucciones del fabricante. Las actividades enzimáticas fueron detectadas mediante geles réplica de agarosa al 1 % (2 mm de grosor), que contenían pectina o pectato al 0,1 % en Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) y CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, según el proceso explicado en el capítulo 3.

### **Electroforesis**

Las proteínas fueron separadas según su peso molecular en geles de poliacrilamida al 12 %, de 1 mm de grosor, utilizando la cubeta Mini Protean de Bio Rad. El gel separador fue preparado en un volumen de 20 ml, con 8 ml de acrilamida (acrilamida 30 %; bisacrilamida 0,8 %), 7,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,8, 100 µl de SDS al 20 %, 16 µl de TEMED y 16 µl de persulfato amónico al 10 %. El gel concentrante fue preparado en un volumen de 10 ml, con 1,7 ml de acrilamida, 1,25 ml de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50 µl de SDS al 20 %, 10 µl de TEMED y 40 µl de persulfato amónico al 10 %.

Las muestras, disueltas en Tris-HCl 62,5 mM, SDS al 1 %, β-mercaptoetanol al 1 %, azul de bromofenol al 2 % y glicerol al 0,002 %, fueron hervidas durante 4 min. El tampón de electroforesis fue glicina 192 mM y SDS al 0,1 % en Tris-HCl 25 mM pH 8,3. El voltaje aplicado fue de 80 V en el proceso de concentración y de 180 V durante la separación.

Los geles fueron teñidos con azul Coomassie R-250 (Sigma) al 0,1 % en una solución de metanol:acético:agua (40:10:50), y desteñidos con la misma solución. Para estimar el peso molecular fueron utilizados patrones de peso molecular entre 200 y 6,5 kDa (Bio Rad).

## Caracterización

La especificidad por el sustrato fue determinada valorando la actividad enzimática en mezclas de reacción en presencia de pectina o pectato, a la misma concentración.

Con el fin de determinar si la degradación del sustratos se produce mediante un mecanismo "endo" o "exo", se siguió el descenso en viscosidad de las mezclas de reacción y, simultáneamente, la liberación del producto insaturado, durante 30 min, en mezclas de reacción con la misma proporción enzima-sustrato.

La viscosidad relativa del sustrato fue definida como  $100 \times (t_i - t_0) / (t_i - t_0)$ , donde  $t_i$  es el tiempo de flujo (segundos) de la mezcla de reacción a diferentes tiempos,  $t_i$  es el tiempo de flujo (segundos) de la mezcla de reacción a tiempo 0 y  $t_0$  el tiempo de flujo (segundos) del tampón. De las curvas de descenso en viscosidad frente al tiempo se dedujo el  $t_{50}$ , tiempo en el cual la viscosidad relativa del sustrato es reducida en un 50 %,  $((t_i - t_0)/2) + t_0$ . Tomando como 100 % los enlaces disponibles al principio de la reacción fue calculado el porcentaje de enlaces rotos al tiempo en el que la viscosidad relativa del sustrato se había reducido al 50 %.

Para la determinación del pH óptimo se utilizó tampón Tris-HCl (pH 7,0-9,0) o tampón glicina (pH 9,0-11,0), ambos 0,05 M. Los controles fueron valorados sin enzima.

La temperatura óptima fue determinada midiendo la actividad enzimática a temperaturas entre 30 y 65 °C. Los controles fueron valorados sin enzima.

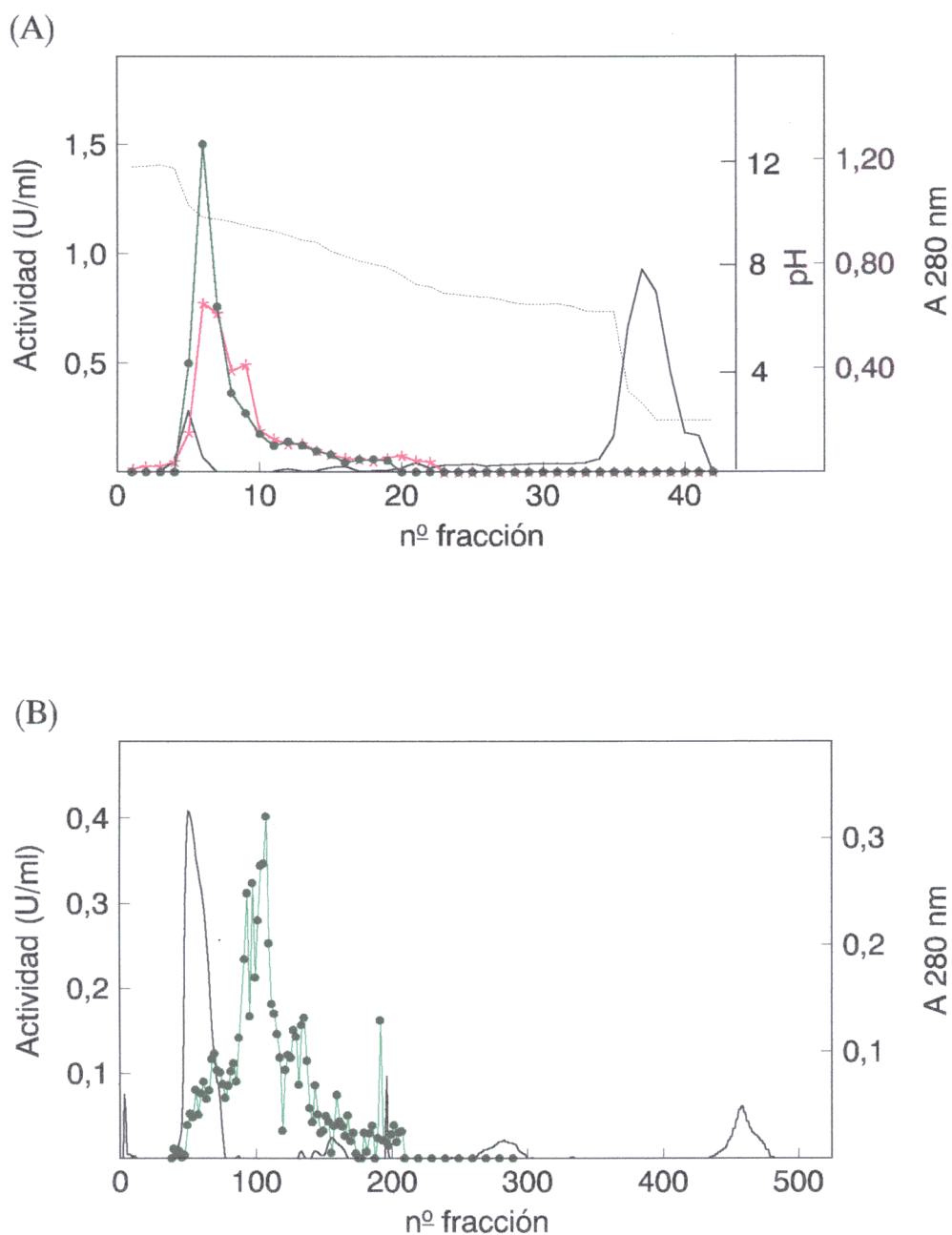
El efecto del calcio fue determinado en mezclas de reacción que contenían EDTA 0,005 M o distintas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (0-0,02 M).

## RESULTADOS

### Purificación

El proceso de purificación ha permitido la separación de las tres actividades liasas con dos columnas de IEF (figura 6.2). Las tablas 1 y 2 resumen el proceso de purificación. Este fue seguido realizando isoelectroenfocos analíticos para comprobar el grado de contaminación con otras proteínas (figura 6.3 y 6.4). En primer lugar, el filtrado fúngico fue precipitado hasta el 40 % para quitar la pectina del medio, y a continuación fue concentrado. En el primer IEF preparativo ambas actividades, PNL y PL, fueron recuperadas en el mismo volumen (figura 6.2A), obteniéndose una fracción parcialmente purificada que incluía las tres liasas y la PME (figuras 6.3 y 6.4). En el segundo IEF preparativo (figura 6.2B) se separaron las tres liasas y la PME, que apareció en una fracción contaminada con la liasa más básica, tal como se deduce del isoelectroenfoco analítico de las fracciones (figuras 6.3 y 6.4). Las tinciones usando geles réplica de agarosa, con pectina o pectato, confirmó la identificación de una pectín liasa (PNL), con pI 9,20 y de dos pectato liasas (PL1 y PL2) con pIs de 9,00 y 8,65, respectivamente. Las tres actividades actuaban con los dos sustratos pero mostraban preferencia por uno de ellos.

La fracción que contenía la PNL fue resuelta por electroforesis en una sola banda de proteínas de peso molecular 30,5 kDa. A partir de la fracción PL1 se obtuvieron dos bandas de pesos moleculares 42 y 38 kDa, mientras que en la PL2 se detectaron varias bandas contaminantes (figura 6.5).



**Figura 6.2.** Proceso de purificación de las liasas de FORL r2 producidas sobre pectina: primer isoelectoenfoque preparativo (A) y segundo isoelectoenfoque (B). La actividad ha sido valorada por incremento en absorbancia a 235 nm con pectina (-●-) o pectato (-x-) como sustrato. (- - -) pH, (—)  $A_{280nm}$ .

**Figura 6.3.** Tinciones específicas de IEF analítico de las fracciones obtenidas en los distintos pasos de purificación. Las actividades fueron detectadas usando geles réplica de agarosa que contenían el respectivo sustrato a pH 8,0. Calle 1: muestra procedente del primer IEF preparativo, tinciones con geles que contenían pectina (calle 11) y pectato (calle 12). Calles 2, 3, 4 y 5: fracciones obtenidas después del segundo isoelectroenfoque. Calle 2: fracción rica en PME, teñida con gel de agarosa que contenía pectina. Calle 3: PNL purificada, teñida con gel de agarosa que contenía pectina. Calle 4: PL1 purificada, teñida con gel de agarosa que contenía pectato. Calle 5: PL2 purificada, teñida con gel de agarosa que contenía pectato.

**Figura 6.4.** Tinción de plata del gel de isoelectroenfoque analítico. Calle 1: muestra procedente del primer IEF preparativo. Calle 2: fracción rica PME. Calle 3: PNL purificada. Calle 4: PL1 purificada. Calle 5: PL2 purificada. M: marcadores de pI.

**Figura 6.5.** Tinción de plata del gel de electroforesis en SDS de las fracciones obtenidas en el segundo isoelectroenfoque. Calle 1: fracción que contiene a la PL2. Calle 2: PL2 purificada. Calle 3: PNL purificada. M: marcadores de peso molecular.

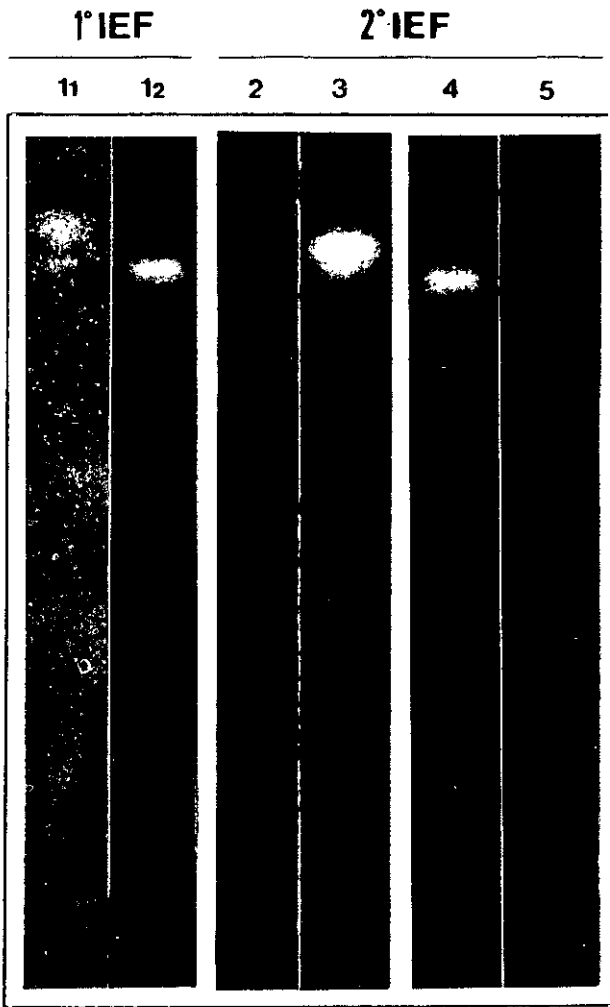


Figura 6.3

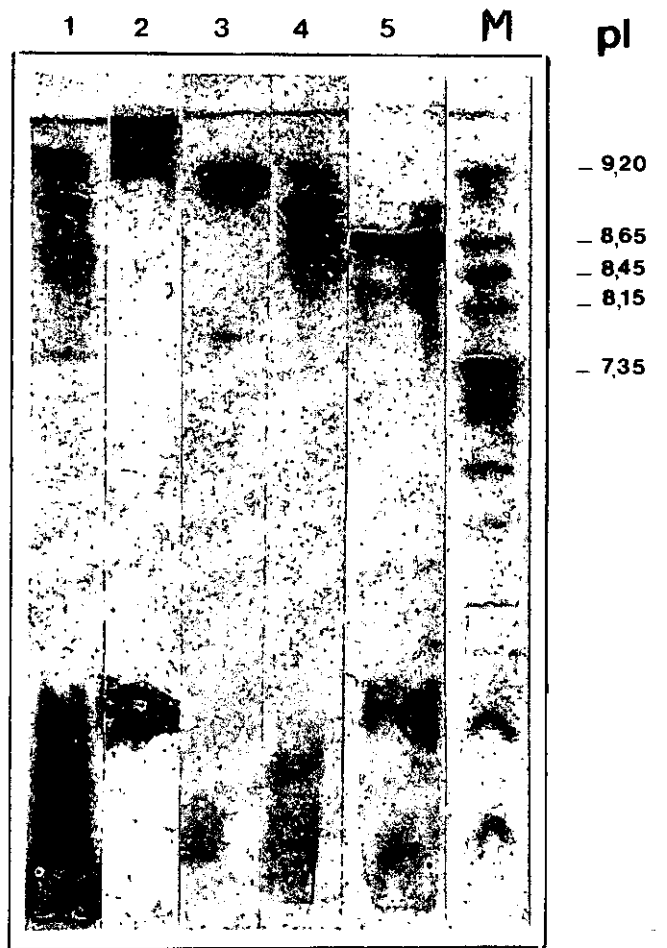


Figura 6.4

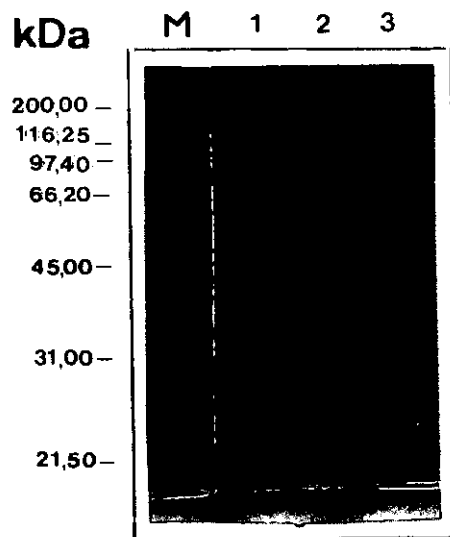


Figura 6.5



Paso	Proteínas	Actividad total	Actividad específica	Purificación	Rendimiento
	mg	U	U.mg <sup>-1</sup>		%
Filtrado	65,75	12,43	0,19	-	100
Concentrado	13,23	10,99	0,83	4,39	88,41
1° IEF	1,31	10,41	7,95	42,06	83,75
2° IEF	0,128	1,35	10,54	55,77	10,86

**Tabla 6.1.** Tabla resumen del proceso de purificación para la pectín liasa. La actividad fue valorada por incremento en  $A_{235nm}$  en mezclas de reacción con pectina.

Paso	Proteínas	Actividad total	Actividad específica	Purificación	Rendimiento
	mg	U	U.mg <sup>-1</sup>		%
Filtrado	65,75	9,9	0,1506	-	100
Concentrado	13,23	8,25	0,62	4,11	83,33
1° IEF	1,31	8,04	6,13	40,70	81,21
2° IEF					
PL1	0,171	0,84	4,79	31,81	8,48
PL2	0,026	0,13	4,82	32,00	1,31

**Tabla 6.2.** Tabla resumen del proceso de purificación para las pectato liasas. La actividad fue valorada por incremento en  $A_{235nm}$  en mezclas de reacción con pectato.



### Caracterización

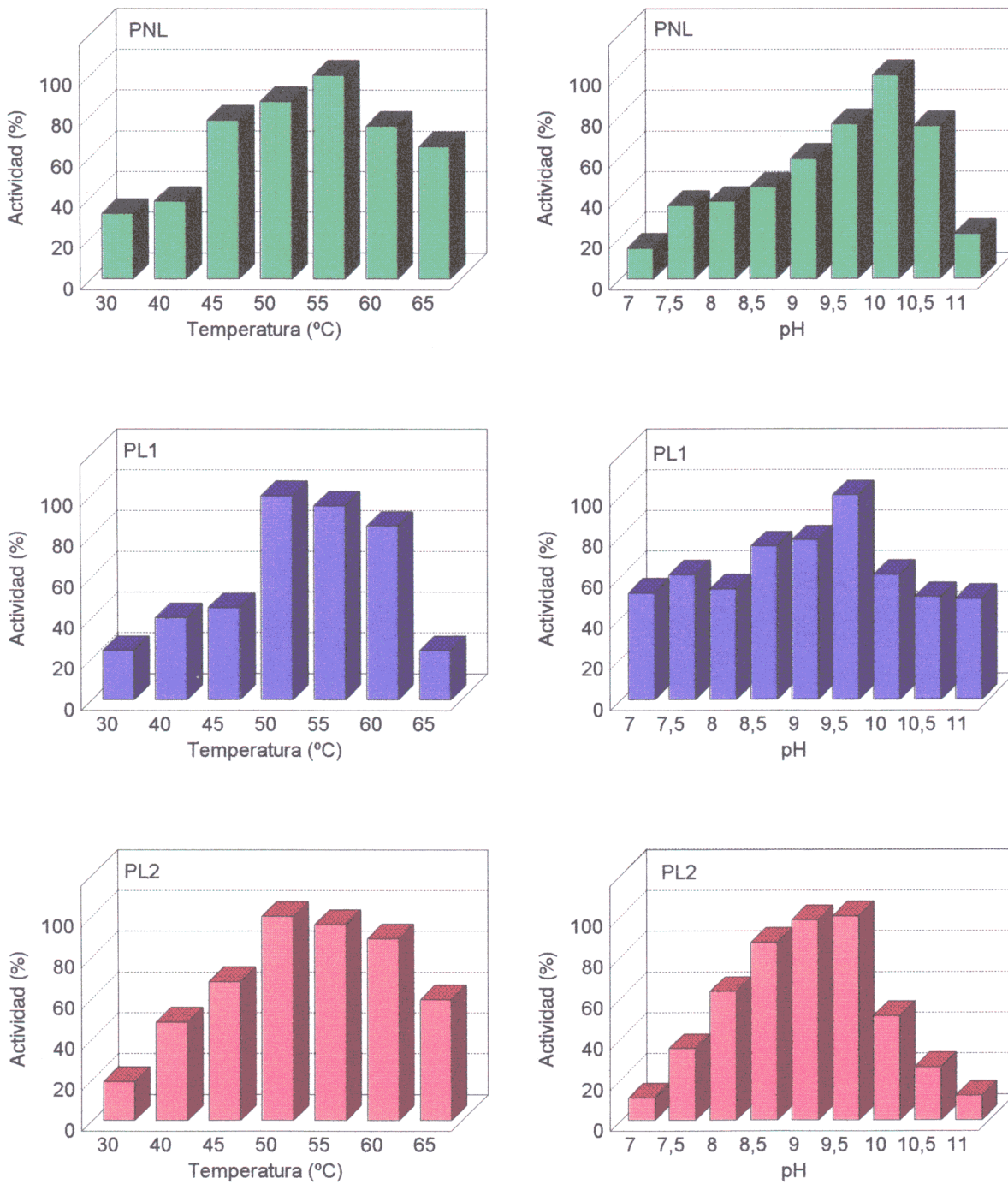
La valoración de actividades por incremento en absorbancia a 235nm, con pectina o pectato, confirmó lo observado en las tinciones de los geles. La liasa más básica mostró preferencia por pectina mientras que las otras dos por pectato, aunque las tres fueron activas con los dos sustratos (tabla 6.5).

	Sustrato		Relación	
	NaPP (U.mg <sup>-1</sup> )	Pectina (U.mg <sup>-1</sup> )	N/P	P/N
PNL	5,36	10,54	0,5	2,0
PL1	4,79	1,76	2,7	0,4
PL2	4,82	2,55	1,9	0,5

**Tabla 3.3.** Actividad específica de las tres liasas medida por incremento en  $A_{235nm}$  con pectato (NaPP) o pectina y relación entre ellas. Valores superiores a 1 en N/P demuestran preferencia por pectato y valores superiores a 1 en P/N demuestran preferencia por pectina.

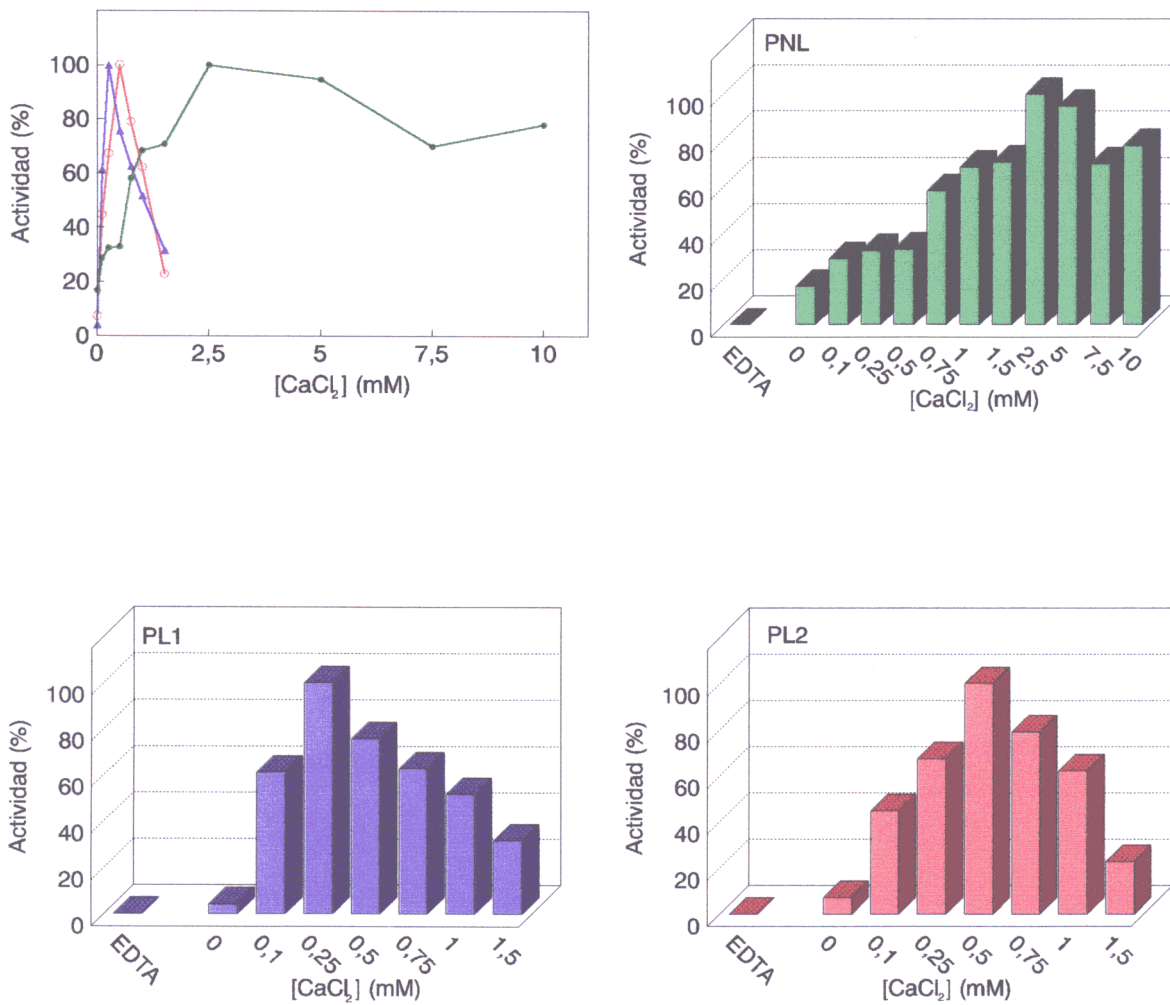
Una vez determinada la preferencia de sustrato, cada actividad fue valorada con su sustrato, pectina para la PNL y pectato para las PL1 y PL2. En primer lugar se determinó la temperatura óptima y, a continuación, el pH óptimo a la temperatura obtenida como óptima. Las tres actividades presentaban temperaturas y pHs óptimos altos (figura 6.6). La PNL exhibió máxima actividad a 55 °C y pH 10. La PL1 y la PL2 a 50 °C y pH 9,5.

La adición de EDTA a las mezclas de reacción provocó una completa pérdida de actividad de las tres liasas mientras que la adición de CaCl<sub>2</sub> aumentó la actividad (figura 6.6). Para una concentración de 0,08 % de pectina o pectato



**Figura 6.4.** Temperatura y pH óptimo de las tres liasas purificadas, PNL (verde), PL1 (azul) y PL2 (rojo). Se midió el incremento en absorbancia a 235 nm en mezclas de reacción con pectina, para la PNL, o pectato, para las dos PL. La temperatura óptima fue determinada incubando a temperaturas entre 30 y 65 °C y el pH óptimo utilizando tampón Tris-HCl (pH 7,0-9,0) o tampón glicina (pH 9,0-11,0). En ambos casos se valoraron controles sin enzima.



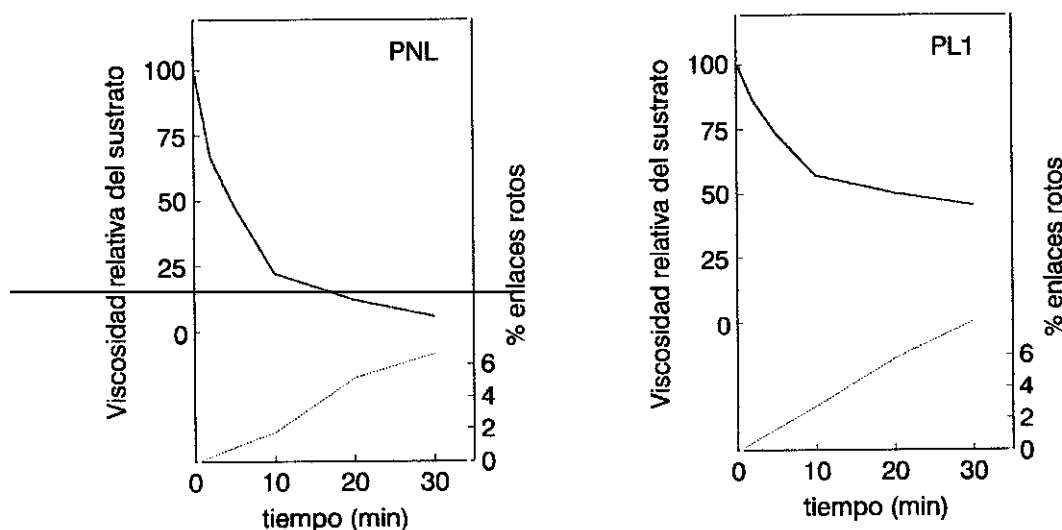


**Figura 6.5.** Concentración óptima de calcio de las tres actividades liasas purificadas, PNL (verde), PL1 (azul) y PL2 (rojo). El incremento en absorbancia a 235 nm se midió en mezclas de reacción con pectina, para la PNL, o pectato, para las dos PL y EDTA (0,005 M) o distintas concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (0-0,02 M).



en las mezclas de reacción, la concentración óptima de cloruro de calcio fue diferente para cada enzima, 2,5, 0,25 y 0,5 mM para PNL, PL1 y PL2, respectivamente. Aunque la concentración óptima de calcio para la PNL fue mayor, su activación por calcio fue menor, valores superiores o inferiores al óptimo no modificaron en gran medida la actividad y mostró actividad en ausencia de calcio. En el caso de las PL, la actividad en ausencia de calcio fue muy pequeña y valores ligeramente superiores o inferiores al óptimo disminuyeron considerablemente la actividad.

Con el fin de determinar el mecanismo de acción de las enzimas purificadas, se valoró el descenso en viscosidad y el incremento en A 235nm en idénticas mezclas de reacción. Para la PNL, en el tiempo en el que la viscosidad del sustrato se redujo al 50 %, el porcentaje de enlaces rotos fue del 0,7 % (figura 6.7). En el caso de la PL1 se obtuvo un 6 % de enlaces rotos para un descenso en viscosidad del sustrato del 50 % (figura 6.7).



**Figura 6.7.** Modo de acción de PNL (verde) y PL1 (azul). El descenso en la viscosidad relativa de las mezclas de reacción (---) y la liberación de productos insaturados (—) fue determinado durante 30 min de reacción. De las curvas de reducción en viscosidad relativa frente a tiempo se obtuvo el valor  $t_{50}$  (tiempo en el que se reduce la viscosidad relativa del sustrato al 50 %). A este tiempo de reacción fue calculado el porcentaje de enlaces rotos. Para detalles ver Materiales y Métodos.

## Sinergismo

Todas las posibles combinaciones de liasas fueron añadidas a mezclas de reacción que contenían ácido poligalacturónico o pectina, determinando el incremento en absorbancia a 235 nm producido por min. La tabla 6.3 muestra estas medidas. No se observó ningún efecto de sinergismo entre la PNL y alguna de las dos pectato liasas (PL1 o PL2); tanto con ácido poligalacturónico como con pectina, las medidas son iguales o inferiores a la suma de las actividades individuales medidas. Sí se observó sinergismo entre las dos pectato liasas, siendo mayor con pectato (sustrato más específico) que con pectina. La combinación de las tres no dio sinergismo.

El efecto de la PME sobre las tres actividades liasas fue también estudiado (tabla 6.4). En presencia de pectato no hubo ningún efecto, pero en presencia de pectina hubo sinergismo en los tres casos.

Combinación de enzimas	NaPP			Pectina		
	Actividad medida	Actividad esperada	Sinergismo	Actividad medida	Actividad esperada	Sinergismo
PNL/PL1	0,0291	0,0293	0,99	0,0246	0,0396	0,62
PNL/PL2	0,0168	0,0159	1,06	0,0252	0,0341	0,74
PL1/PL2	0,0261	0,0175	1,49	0,0091	0,0081	1,12
PNL/PL1/PL2	0,0343	0,0313	1,09	0,0325	0,0409	0,79

**Tabla 6.3.** Degradación de ácido poligalacturónico (NaPP) o pectina en mezclas de reacción que incluyen distintas combinaciones de liasas. La actividad fue medida como incremento en  $A_{235} \cdot \text{min}^{-1}$ . La actividad esperada fue calculada a partir de la suma de las actividades individuales. Los valores de sinergismo resultaron de la relación entre la actividad medida y la esperada; valores superiores a 1 indican sinergismo positivo.

Combinación de enzimas	NaPP		Sinergismo	Pectina		Sinergismo
	Actividad medida	Actividad esperada		Actividad medida	Actividad esperada	
PME/PNL	0,0141	0,0167	0,84	0,0613	0,0371	1,65
PME/PL1	0,0122	0,0183	0,67	0,0294	0,0111	2,64
PME/PL2	0,0023	0,0050	0,46	0,0077	0,0057	1,37

**Tabla 6.4.** Degradación de ácido poligalacturónico o pectina por cada liasa en presencia de pectín metil esterasa. La actividad fue medida como incremento en  $A_{235} \cdot \text{min}^{-1}$ . La actividad esperada fue calculada a partir de la suma de las actividades individuales. Los valores de sinergismo resultaron de la relación entre la actividad medida y la esperada; valores superiores a 1 indican sinergismo positivo.



## DISCUSIÓN

El proceso de purificación ha permitido la separación de las tres liasas, PNL, PL1 y PL2, con una recuperación del 10,86, 8,48 y 1,31 % respectivamente, y un factor de purificación de aproximadamente 56 para la PNL y 32 para las dos pectato liasas. En primer lugar, el filtrado fúngico fue precipitado solo hasta el 40 % para quitar la pectina del medio y a continuación concentrado, consiguiéndose una alta recuperación del 88 y 83 %, para las dos actividades, PNL y PL. Se evitaba así la poca recuperación obtenida en este paso mediante la precipitación con sulfato amónico entre el 40 y 100 % de saturación (Guevara y col., 1996). En un primer IEF preparativo, las tres liasas, PNL, PL1 y PL2, y la PME eluyeron en el mismo volumen, lo cual permitió su separación del resto de proteínas. Como tercer paso de purificación fueron usadas varias técnicas (filtración en gel, intercambio iónico, electroforesis nativa e IEF preparativo en placa) pero en ningún caso se obtuvo una buena separación ya que las tres liasas son muy similares. Mejores resultados fueron obtenidos mediante un segundo IEF preparativo en columna. El pico de la PNL contenía a la enzima pura ya que se resolvió en una sola banda de proteínas, tanto en isoelectroenfoque analítico (figura 6.4) como en electroforesis en SDS (figura 6.5). En el caso del pico de la PL1, se detectó una única banda en isoelectroenfoque analítico (figura 6.4) y dos por electroforesis en SDS (figura 6.5). Estos resultados se pueden interpretar asumiendo la presencia de una proteína contaminante de la PL1, que tuviera idéntico punto isoeléctrico pero distinto tamaño molecular. Es también posible que la PL1 conste de dos subunidades distintas. Esta posibilidad no ha podido ser confirmada ya que las tres liasas de FORL r2 parecen tener poca carga y no corren bien en electroforesis en condiciones nativas. Por último, el pico de la PL2 estaba contaminado aunque la proteína mayoritaria se enfoca en un punto isoeléctrico de 8,65, correspondiente a la PL2 (figura 6.4).

La tinción usando geles réplica de agarosa con pectina o pectato, confirmó un pI de 9,20 para la PNL y de 9,00 y 8,65 para las dos PLs (PL1 y PL2) (figura 6.3). Las enzimas mostraban puntos isoeléctricos básicos como la mayoría de las liasas descritas tanto de bacterias como en hongos: 10,1 para la pectín liasa de *Rhizoctonia solani* (Bugbee, 1990), mayor de 10 para las pectato liasas de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Bartling y col., 1995), 10 para la pectato liasa de *Amicolata* sp (Brühlmann, 1995), de 7,5 a 10,5 para las liasas de *Erwinia chrysanthemi* (Hugouvieux-Cotte-Pattat y col., 1996), 9,4 para la pectín liasa de *Pseudomonas fluorescens* W51 (Schlemmer y col., 1987), 8,7 para la pectato liasa de FOL (Di Prieto y Roncero, 1996c), 8,6 para la pectín liasa de *Penicillium italicum* (Alaña y col., 1991) y 8,3 para la pectato liasa A de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Crawford y Kolattukudy, 1987). El alto pI de las liasas se ha considerado beneficioso para la ruptura de sustratos pécticos, ya que reduce la repulsión electrostática entre la enzima y el sustrato negativamente cargado (Brühlmann, 1995). No obstante, se han descrito algunas con pIs ácidos como la pectato liasa de *Aspergillus nidulans*, con un pI de 4,2 (Dean y Timberlake, 1989) o una de las pectato liasas de *Erwinia chrysanthemi*, con un pI de 4,5 (Hugouvieux-Cotte-Pattat y col., 1996).

El peso molecular de la PNL, determinado mediante electroforesis en SDS es de 30,5 kDa, que difiere del descrito anteriormente por filtración en gel, 18 kDa (Guevara y col., 1996). La discrepancia puede ser debida a interacciones entre la enzima y el gel, que pueden provocar retrasos en la elución de algunas proteínas, como ha sido descrito para algunas pectín liasas cuando han sido aplicadas a este tipo de geles (Bugbee, 1990; Alaña y col., 1991). Las interacciones entre las enzimas y el gel dan falsos pesos moleculares. Por tanto el valor más real para la PNL es 30,5 kDa. Los pesos moleculares de las dos bandas presentes en la fracción de la PL1 son de 42 y 38 kDa, que corresponderían a las dos subunidades de la PL1 o bien a la PL1 y a la proteína contaminante. Asumiendo que la PL2 es la proteína mayoritaria en la fracción

eluida del segundo electroenfoque preparativo, le correspondería un peso molecular de 66 kDa.

Los pesos moleculares obtenidos por electroforesis son similares a los descritos para otras liasas: 23-29 kDa de las pectato liasas de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Crawford y Kolattukudy, 1987; Guo y col., 1995a, 1995b, 1996), 25 kDa para la pectato liasa de FOL (Di Prieto y Roncero, 1996c), 31 kDa para la pectato liasa de *Amicolata* (Brühlmann, 1995), 32 kDa para la pectín liasa de *Pseudomonas fluorescens* W51 (Schlemmer y col., 1987), 34 kDa para la pectín liasa de *Pseudomonas marginalis* N6301 (Nikaidou, 1995) y *Penicillium italicum* (Alaña y col., 1991), 35 kDa para la pectín liasa de *Rhizoctonia solani* (Bugbee, 1990), 36,5 kDa para la pectín liasa de *Penicillium expansum* (Silva y col., 1993), 40 kDa para pectato liasa de *Aspergillus nidulans* (Dean y Timberlake, 1989), 42 kDa para las pectato liasas de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Bartling y col., 1995) y 89 y 55 kDa las pectín liasas ( $L_1$  y  $L_2$ ) de *Aureobasidium pullulans* LV 10 (Parini y col., 1988). Sólo ha sido descrita una liasa polimérica: la pectín liasa de *Phoma medicaginis* var. *pinodella* tiene un peso molecular de 118 kDa y está constituida por cuatro subunidades idénticas de 29,5 kDa (Pitt, 1988). Por tanto, si se confirma que la PL2 de FORL r2, consta de dos subunidades de pesos moleculares distintos, sería única a este respecto.

La preferencia de sustrato atribuida a las tres liasas en los estudios con filtrados crudos (capítulo 3) ha sido confirmada en las fracciones purificadas. Tanto visualizando las actividades en geles réplica de agarosa con pectina o pectato (figura 6.3), como midiendo el incremento en absorvancia 235 nm de mezclas de reacción con ambos sustratos (tabla 6.5). La PNL mostró el doble de actividad con pectina y las otras dos (PL1 y PL2) el doble de actividad con pectato (tabla 6.5).

Generalmente las enzimas que degradan sustratos no esterificados o con bajo grado de esterificación se denominan pectato liasas y cuando el sustrato está altamente esterificado se denominan pectín liasas (Rexová-Benková, 1973). Se

considera que el sustrato óptimo para la pectato liasa es el D-galacturonano aunque pueden actuar sobre sustratos esterificados; algunas mantienen niveles altos de actividad sobre sustratos parcialmente esterificados, como las pectato liasas de *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, que actúan sobre pectina esterificada (70 %) con una actividad aproximadamente dos veces menor que sobre pectato (Crawford y Kolattukudy, 1987; Guo y col., 1995b). No obstante han sido descritas pectato liasas que actúan preferentemente sobre sustratos parcialmente esterificado. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* produce una pectato liasa (peIB) que no es activa sobre ácido poligalactorónico y sí sobre sustratos esterificados. La enzima es activa sobre sustratos con 95 % de esterificación, aunque el máximo de actividad se obtiene sobre pectina esterificada al 68 % (Heikinheimo y col., 1995). En *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* han sido identificadas tres pectato liasas con preferencia por pectina de grado de esterificación 31 (Bartling y col., 1995). En cuanto a las pectín liasas descritas, algunas no tienen nada de actividad con ácido poligalacturónico, como las de *Rhizoctonia solani* (Bugbee, 1990) y *Penicillium expansum* (Silva y col., 1993); otras, en cambio, actúan con pectina y con ácido galacturónico, como las dos pectín liasas descritas en *Aureobasidium pullulans* LV 10 (Parini, y col. 1988). El grado de esterificación óptimo para el sustrato puede ser elevado como en *Penicillium italicum* (Alaña y col., 1991) y en una pectín liasa ( $L_1$ ) de *Aureobasidium pullulans* (Parini y col., 1988) o puede ser bajo (38 %), como una pectín liasa ( $L_2$ ) de *Aureobasidium pullulans* (Parini y col., 1988).

Liasas con similares preferencias por sustrato han sido descritas indistintamente como PL o PNL. A partir de *Aureobasidium pullulans* LV 10 ha sido purificada una liasa con especificidad por pectina de grado de esterificación 38 a la que se ha identificado como pectín liasa (Parini y col., 1988), mientras que en *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* han sido identificadas tres pectato liasas con preferencia por pectina de grado de esterificación 31 (Bartling y col., 1995). Las diferencias aparecen con pectinas de alto grado de esterificación: en el caso

de *Erwinia* apenas se detecta actividad con pectina esterificada al 68 % y ninguna actividad con pectina al 93 % y la liasa de *Aureobasidium* conserva el 45 % de actividad con pectina esterificada al 75 %. Por otro lado enzimas con preferencia por sustratos 68 % esterificados y sin actividad sobre ácido poligalactorónico han sido identificadas como pectato liasas (Heikinheimo y col., 1995). Como puede verse no existe un criterio universal para la identificación de una enzima como pectín o pectato liasa.

Las tres enzimas presentan temperaturas óptimas altas, 55 °C para la PNL y 50 °C para PL1 y PL2 (figura 6.6). Estas temperaturas son similares a las de otras liasas de hongos y bacterias: 55 °C para la pectato liasa C de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Guo y col., 1995b), 50 °C para la pectín liasa de *Penicillium italicum* (Alaña y col., 1991), 45 °C para la pectato liasa de FOL (Di Prieto y Roncero, 1996c), 40 °C para las dos pectín liasas de *Aureobasidium pullulans* LV 10 (Parini y col. 1988), de 40 a 45 °C para la pectín liasa de *Penicillium expansum* (Silva y col., 1993), y, 40, 50 y 40 °C para tres pectato liasas de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Bartling y col., 1995). Han sido descritas liasas con temperaturas óptimas de hasta 70 °C, como la pectato liasa de *Amicolata* sp (Brühlmann, 1995) o más bajas, como la pectín liasa de *Pseudomonas marginalis*, con una temperatura óptima de 30 °C (Nikaidou, 1995).

Los pHs óptimos, 10 para PNL y 9,5 para PL1 y PL2 son alcalinos (figura 6.6) como para la mayoría de las liasas. Algunas presentan pHs óptimos ligeramente básicos, 7,5 el de una de las pectín liasas de *Aureobasidium pullulans* (L<sub>2</sub>) (Parini, y col. 1988), 8,0 el de las pectín liasas de *Pseudomonas marginalis* (Nikaidou, 1995) y de *Rhizoctonia solani* (Bugbee, 1990), de 8,0 a 8,5 el de la pectín liasa de *Pseudomonas fluorescens* W51 (Schlemmer y col., 1987) y de 8,3 a 9,2 las liasas de *Erwinia chrysanthemi*, (Hugouvieux-Cotte-Pattat y col., 1996). Otros son más básicos, como el de la pectín liasa de *Penicillium italicum* o la pectato liasa de FOL, con pH óptimo de 9,0 (Alaña y col., 1991; Prieto y Roncero, 1996c), las tres liasas purificadas de *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, con

pHs óptimos entre 9,5 y 10 (Crawford y Kolattukudy, 1987; Guo y col., 1995a, 1995b, 1996), o la pectato liasa de *Amicolata* sp (Brühlmann, 1995). No obstante, existen excepciones, una de las pectín liasas de *Aureobasidium pullulans* LV 10 (L<sub>1</sub>), presenta un pH óptimo ligeramente ácido, 5,5 (Parini y col. 1988) y la de *Penicillium expansum* neutro, 7,0 (Silva y col., 1993).

Las liasas de FORL r2 muestran dependencia de calcio, siendo mayor en el caso de las dos pectato liasas (figura 6.7). El hecho de que se detecte actividad en ausencia de calcio puede deberse a la presencia de pequeñas cantidades del ión en el sustrato utilizado, que en presencia de EDTA son eliminadas por quelación. El calcio aumenta la actividad de la mayoría de las liasas. Algunas tienen un absoluto requerimiento de calcio, como la pectín liasa de *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (Pitt, 1988), la pectato liasa de *Amicolata* sp (Brühlmann, 1995) y las cuatro pectato liasas descritas en *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Crawford y Kolattukudy, 1987; Guo y col., 1995a, 1995b, 1996). En algunos casos, como en el de la pectín liasa de *Rhizoctonia solani*, aunque el calcio aumenta la actividad, no es esencial (Bugbee, 1990). En *Aureobasidium pullulans* LV 10 han sido detectadas dos pectín liasas (L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>) que actúan en ausencia de calcio y son activadas por él; la adición de EDTA no afecta a L<sub>1</sub> pero sí inhibe parcialmente a L<sub>2</sub> (Parini y col. 1988). Por último, algunas no se ven afectadas por calcio ni por EDTA, como la pectín liasa de *Penicillium italicum* (Alaña y col., 1990), la de *Penicillium expansum* (Silva y col., 1993) o la de *Pseudomonas fluorescens* W51 (Schlemmer y col., 1987). En *Fusarium solani* f. sp. *pisi* se ha demostrado que la concentración de calcio óptima es dependiente de la concentración de sustrato (Crawford y Kolattukudy, 1987). En general, parece que enzimas con preferencia por pectina tienen una menor dependencia de calcio que las enzimas con preferencia por pectato, como ocurre con las liasas de FORL r2.

La PNL muestra, como todas las pectín liasas descritas, un comportamiento de tipo "endo", con un porcentaje de enlaces rotos del 0,7 % para un descenso en viscosidad del sustrato del 50 % (figura 6.7). En el caso de la PL1, el 6 % de

enlaces rotos obtenido para un descenso en viscosidad del sustrato del 50 % (figura 6.7) indica un comportamiento relativamente "exo", ya que este 6 % es un valor más elevado que los que se citan en la bibliografía para enzimas de tipo "endo" (Cooper, 1983).

Se ha descrito la existencia de un efecto sinérgico entre tres pectato liasas de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, que implica un aumento en actividad de dos de ellas cuando actúan sobre pectina en presencia de la tercera (Bartling y cols., 1995). Un efecto similar ha sido detectado en el caso de las pectato liasas de FORL r2, PL1 y PL2, y en este caso el sinérgico se manifiesta para los dos sustratos, pectina y pectato, siendo mayor en el caso de pectato (tabla 6.3). Sin embargo la presencia de PNL en las mezclas de reacción no provocó aumentos de actividad. Este efecto podría estar relacionado con la existencia de colaboración entre las dos pectato liasas en el ataque al sustrato, lo cual mejoraría su degradación cuando ambas están presentes. La adición de una fracción rica en pectín metil esterasa aumentó la actividad de las tres liasas (tabla 6.4), pero en este caso el efecto es detectado solo en presencia de pectina, lo que parece indicar que la desmetilación de la pectina favorece la acción de las liasas. Esto parece lógico en el caso de las dos pectato liasas y en el caso de la pectín liasa, solo podría ser explicado si existiera una preferencia de sustrato por pectina pero con un grado de metilación más bajo.

Algunas de las características de la PNL purificada pueden ser significativas para la patogénesis. Primero, el bajo peso molecular de la proteína puede conferirle una alta movilidad, esto podría ser beneficioso para su movimiento a través de las paredes celulares. En segundo lugar, es una enzima tipo "endo", hecho que puede ser esencial para la maceración de tejidos (Bateman y Bashman, 1976; Cooper, 1983). Las pectato liasas, de tipo "exo" y producidas de forma constitutiva por FORL r2 a bajos niveles (capítulo 3), podrían estar implicadas en la movilización inicial de los sustratos pécticos que desencadena el proceso de inducción de todo el complejo péctico.

**Conclusiones**





Los dos aislamientos de FORL, r2 y r6, presentan un comportamiento muy similar en cuanto al crecimiento, a las polisacaridasas producidas (poligalacturonasa, pectín liasa,  $\beta$ -1,4-glucanasa, avicelasa y  $\beta$ -glucosidasa) y, en el caso particular de las enzimas pécticas, tanto en relación a las condiciones óptimas para su producción como con respecto a los tipos de enzimas producidas.

La adición de  $\text{CaCl}_2$  al medio provoca, en los dos aislamientos, una disminución del crecimiento, de las proteínas totales y de la producción de las enzimas pécticas.

En presencia de pectato, además del descenso en los niveles de actividades pécticas, se produjo menor crecimiento y menor cantidad de proteínas que en presencia de pectina. Esto indica que la utilización de pectato por el hongo es menos eficiente que la utilización de pectina.

El aislamiento r2 produce pectín liasa, pectato liasa y poligalacturonasa que son inducidas por ácido galacturónico y están sujetas a represión catabólica. Las primeras actividades detectadas en ausencia de inductor, son pectato liasa y poligalacturonasa. La pectín liasa sólo se detecta en presencia de ácido galacturónico.

Comparando los cultivos tamponados a pH 8,0 ó 5,5, no se han detectado mayores niveles de liasas en los cultivos pH 8,0 como ha sido descrito en otros hongos. Por el contrario la alcalinización del medio provoca un descenso en las tres actividades durante todo el período de cultivo.

La pectín liasa tiene un comportamiento de tipo "endo", mientras que la pectato liasa y la poligalacturonasa tienen un comportamiento de tipo "exo". Se

han detectado tres formas con actividad liasa, con pIs de 9,20, 9,00 y 8,65, y cuatro con actividad poligalacturonasa, la principal con pI 7,35, dos con pIs 6,85 y 6,55, y una minoritaria con pI 9,30. También se ha detectado una pectín metilesterasa con un pI próximo a 9,5. Las tres liasas actúan sobre pectina y pectato en condiciones alcalinas y tienen un absoluto requerimiento de calcio. La más alcalina tiene preferencia por pectina, mientras que las otras dos son más activas sobre pectato. Las poligalacturonasas son más activas a pH ácido y son inhibidas por calcio.

El ácido galacturónico afecta drásticamente a la regulación a nivel transcripcional. En comparación con la glucosa, disminuye total o parcialmente la síntesis de numerosas proteínas mientras que induce otras. Algunas de ellas pueden asignarse a enzimas pécticas en base a su peso molecular y/o punto isoeléctrico.

En el caso del gen de poligalacturonasa se ha comprobado que la regulación se produce a nivel transcripcional. En presencia de ácido galacturónico aumentan los niveles de RNAm, mientras que en glucosa los niveles no son suficientes para su detección mediante Northern blot.

En el caso de los genes de las liasa se ha visto que al menos uno de ellos tiene una regulación a nivel transcripcional. Los niveles de RNAm, muy bajos en glucosa, aumentan en presencia de ácido galacturónico.

Se ha obtenido una sonda de FORL r2, de 745 pb, para el gen de poligalacturonasa. Su secuencia presenta una gran homología con la de otro aislamiento (r13), la de FOL y la de *F. moniliforme*.

Se ha podido comprobar la presencia de secuencias de cierta homología

con el gen de pectato liasa de *F. solani*. Aparece una copia por genoma haploide en FORL r2 y r13 y FOL

La pectín liasa (PNL) con pI 9,20, purificada a homogeneidad, presenta un peso molecular de 30,5 kDa, habiéndose confirmado su preferencia por pectina, su requerimiento de calcio y un comportamiento de tipo "endo". La pectato liasa con pI de 9,00 (PL1), purificada 32 veces, se resuelve mediante electroforesis en SDS en dos bandas de pesos moleculares 42 y 38 kDa, que podrían corresponder a dos subunidades. La pectato liasa con pI de 8,65 (PL2) ha sido purificada parcialmente y, de los resultados obtenidos mediante electroforesis en SDS, se podría estimar un peso molecular de 66 kDa. Se ha confirmado la preferencia por pectato y el requerimiento de calcio de ambas pectato liasas. La dependencia de calcio de las liasas de FORL r2 es mayor en el caso de las dos pectato liasas, que muestran un comportamiento "exo", más marcado en el caso de PL2.

Las tres enzimas presentan temperaturas óptimas altas, 55 °C para la PNL y 50 °C para PL1 y PL2, y pHs óptimos alcalinos, 10 para PNL y 9,5 para PL1 y PL2.

Ambas pectato liasas (PL1 y PL2) podrían cooperar en la degradación de sustratos pécticos ya que existe sinergismo en su actuación. La adición de una fracción rica en pectín metilesterasa aumentó la actividad de las tres liasas en presencia de pectina, lo que parece indicar que la desmetilación de la pectina favorece la acción de las liasas.



## Bibliografia



- Aist, J.R. 1976. Cytology of penetration and infection - Fungi. En: Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. R. Heitefuss y P.H. Williams, eds. pags. 197-221. Springer-Verlag. Berlín.
- Albersheim, P. 1976. The primary cell wall. En: Plant Biochemistry. J. Bonner y J.E. Varner, eds., pags. 225-273. Academic Press. New York.
- Alaña, A., LLama, M.J., y Serra, J.L. 1991. Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. FEBS Letters 280(2):335-340.
- Allen, P.J. 1976. Spore germination and its regulation. Control of spore germination and infection structure formation in the fungi. En: Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. R. Heitefuss y P.H. Williams, eds. pags. 51-85. Springer-Verlag. Berlín.
- Armstrong, G.M., y Armstrong, J.K. 1975. Reflections on the wilt fusaria. Annu. Rev. Phytopathol. 13: 95-103.
- Aspinall, G.O. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. En "The Biochemistry of Plants" N.E. Tolbert, ed., pags. 91-162, Academic Press, New York.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. eds. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley y Sons, N.Y. pags. 4.1.1-4.1.8.
- Baron, C. y Zambryski, P.C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: Variations on a common theme. Annu Rev. Genet. 29: 107-129.
- Baron-Epel, O., Gharyl, P.K. y Schindler, M. 1988. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. Planta 175: 389-395.
- Barras, F., van Gijsegem, F., y Chatterjee, A.K. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Annu. Rev. Phytopathol.32: 201-234.
- Bartling, S., Wegener, C., y Olsen, O. 1995. Synergism between *Erwinia pectate*



- lyase isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin. *Microbiology* 141: 873-881.
- Bateman, D.F. 1966. Hydrolytic and *trans*-eliminative degradation of pectic substances by extracellular enzymes of *Fusarium solani* f. *phaseoli*. *Phytopathology* 56: 238-244.
- Bateman D.F., 1972. The polygalacturonase complex produced by *Sclerotium rolfsii*. *Physiological Plant Pathology* 2: 175-184
- Bateman, D.F. 1976. Plant cell wall hydrolilysis by pathogens. En *Biochemical aspects of plant-parasite relationships*. J. Friend y D.R. Threlfall, eds. pags.79-103. Academic Press. London.
- Bateman, D.F. y Bashman, H.G. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. En: *Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Physiological Plant Pathology*. Heitefuss y P.H. Williams, eds. pags. 316-355. Springer Verlag Berlin.
- Bateman, D.F. y Beer, S.V. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55: 204-211.
- Beckman, C.H. 1987. *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. APS Press St. Paul, Minnesota.
- Benhamou, N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82: 1185-1193.
- Benhamou, N., Chamberland, H., Ouellette, G.B. y Pautzé, F.J. 1988. Detection of galactose in two fungi causing wilt diseases and their plant host tissues by means of gold-complexed *Ricinus communis* agglutinin I. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 249-266
- Benhamou, N., Charest, P.M. y Jarvis, W.R. 1989a. Biology and host-parasite relations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. En: *Vascular wilt diseases of plants*. E.C. Tjamos y C.H. Beckman, eds. pags. 95-105.

Springer-Verlag, Berlin.

- Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A. y Legrand, M. 1989b. Immunogold localization of  $\beta$ -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *The Plant Cell* 1: 1209-1221.
- Benhamou, N., Chamberland, H. y Pauzé, F.J. 1990a. Implication of pectic components in cell surface interactions between tomato root cells and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. A cytochemical study by means of a lectin with polygalacturonic acid-binding specificity. *Plant Physiology* 92: 995-1003.
- Benhamou, N., Joosten, M.H.A.J. y De Wit, J.G.M. 1990b. Subcellular localization of chitinase and its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiology* 92: 1108-1120.
- Benhamou, N., Mazau, D. y Esquerre-Tugaye, M.-T. 1990c. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*: study of a compatible interaction. *Molecular Plant Pathology* 80 (2):163-173.
- Benhamou, N., Mazau, D., Grenier, J. y Esquerre-Tugaye, M.-T. 1991. Time-course of the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in root cells of susceptible and resistant tomato plants infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Planta* 184: 196-208.
- Bergmeyer, H.U. y Bernt, E. 1974. Determination with glucose oxidase and peroxidase. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer, ed. pags. 1205-1215. Verlag Chemie and Academic Press, N. Y.
- Berry, S.Z. y Hoakes, G.L. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato. *HortScience* 22: 110-111.
- Biehn, W.L. y Dimond, A.E. 1971a. Effect of galactose on polygalacturonase production and pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 61: 242-243.

- Biehn, W.L. y Dimond, A.E. 1971b. Effect of pectin source and sugars on polygalacturonase production by *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* 61: 745-746.
- Bishop, C.D. y Cooper, R.M. 1983a. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 15-27.
- Bishop, C.D. y Cooper, R.M. 1983b. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases. I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 323-343.
- Bishop, C.D. y Cooper, R.M. 1984. Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. II. Invasion of resistant cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 277-289.
- Blais, P., Rogers, P.A. y Charest, P.M. 1992. Kinetics of the production of polygalacturonase and pectin lyase by two closely related *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Experimental Mycology* 16: 1-7.
- Boller, T. 1985. Induction of hidrolases as a defense reaction against pathogens. En: *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. J.L. Key y T. Kosuge, eds. pags. 247-262. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Brammall, R.A. y Higgins, V.J. 1988a. A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistant to *Fusarium* crown and root rot disease. *Canadian Journal of Botany* 66: 915-925.
- Brammall, R.A. y Higgins, V.J. 1988b. The effect of glyphosate on resistance of tomato to *Fusarium* crown and root rot disease and on the formation of host structural defensive barriers. *Canadian Journal of Botany* 66: 1547-1555.
- Brett, C. y Waldron, K. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls. H.U. M. Black y J. Chapman, eds. Unwin Hyman. London.
- Brühlmann, F., 1995. Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amicolata* sp.. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10): 3580-3585.

- Bugbee, W.M. 1990. Purification and characteristics of a pectin lyase from *Rhizoctonia solani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36:15-25.
- Burges, L.W. 1981. General ecology of the fusaria. En: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun y R.J. Cook, eds. pags. 225-235. Pennsylvania State University Press.
- Bussink, H.J.D., Buxton, F.P., Fraaye, B.A., De Graff, L.H. y Visser, J. 1992. The poligalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur. J. Biochem.* 208: 83-90.
- Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F. y De Lorenzo, G. 1993a. *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 453-462.
- Caprari, C., Richter, A., Bergmann, C., Lo Cicero, S., Salvi, G., Cervone, F., y De Lorenzo, G. 1993b. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycol. Res.* 97:497-505.
- Caprari, C., Mattei, B., Basile, M.L., Salvi, G., Crescenzi, V., De Lorenzo, G. y Cervone, F. 1996. Mutagenesis of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP). *Mol. Plant. Microbe Interact.* 9:617-624 *Mycol. Res.* 97:497-505.
- Carbonell, C., Cifuentes, D., Tello, J. y Cenis, J.L. 1994. Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *F. o. f. sp. radialis-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD. *Bol. San. Veg. Plagas* 20: 919-926.
- Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3(1): 1-30.

- Cervone, F., De Lorenzo, G., Aracri, B., Bellincampi, D., Caprari, C., Clark, A.J., Desiderio, A., Devoto, A., Leckie, F., Mattei, B., Nuss, L. y Salvi, G. 1996. The role of poligalacturonase, PGIP and pectin oligomers in fungal infection. En: Pectins and Pectinases. Proceedings of an International Symposium, Wageningen, The Netherlands. J.Visser y A.G.J. Voragen, eds. pags. 191-205. Elsevier Science B.V.. Amsterdam.
- Collmer, A. 1987. Pectic enzymes and bacterial invasion of plants. En: Plant-Microbe Interactions. Vol 2. Molecular and Genetic Perspectives. T. Kosuge y E.W. Nester, eds. pags. 253-284. Macmillan, N. Y.
- Collmer, A y Keen, N.T. 1986. The role of pectin enzymes in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. 24:383-409
- Collmer, A., Ried, J.L., y Mount, M.S. 1988. Assay methods for pectic enzymes. En: Methods in Enzymology. Vol. 161. Biomass Part B Lignin, Pectin, and Chitin. W.A. Wood y S.T. Kellogg, eds. pags. 329-335. Academic Press Inc., London.
- Condit, C.M. y Meagher, R.B. 1987. Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. Mol. Cell Biol. 7: 4273-4279.
- Cooper, R.M. 1983. The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. En: Biochemical Plant Pathology. J. Callow, J. Wiley y Sons, eds. pags. 101-35. N. Y.
- Cooper, R.M. 1984. The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage. En: Plant diseases: infection, damage and loss. R.K.S. Wood y G.J. Jellis, eds., pags. 13-27. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- Cooper, R.M. y Wood, R.K.S. 1973. Induction of synthesis of extracellular cell-wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. Nature 246: 309-311.
- Cooper, R.M. y Wood, R.K.S. 1975. Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiological Plant Pathology 5: 135-156.
- Cooper, R.M., Rankin B. y Wood, R.K.S. 1978. Cell wall-degrading enzymes of

- vascular wilt fungi. II. Properties and modes of action of polysaccharidases of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* 13: 101-134.
- Coughlan, M.P. y Ljungdahl, L. J. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic systems. En: *Biochemistry of Cellulose Degradation*. J.-P. Aubert, P. Beguin y J. Millet, eds., pags. 11-30. Academic Press, London.
- Crawford, M.S. y Kolattukudy, P.E. 1987. Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: purification, characterization, *in vitro* translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258: 196-205.
- Chamberland, H., Charest, P.M., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J. 1985. Chitinase-gold complex used to localize chitin ultrastructurally in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, compared with a chitin specific gold-conjugated lectin. *Histochemical Journal* 17: 313-321.
- Chamberland, H., Benhamou, N., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J. 1989. Cytochemical detection of saccharide residues in paramural bodies formed in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 131-146.
- Charest, P.M., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J. 1984. Cytochemical observations of early infection process by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants. *Canadian Journal of Botany* 62: 1232-1244.
- Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P. y Delmer, D.P. 1980 The primary cell walls of flowering plant. En: *The Biochemistry of Plants*. N.E. Tolbert, ed. pags. 91-162. Academic Press, New York.
- Dean, R. y Timberlake, W.E. 1989. Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (*pelA*). *The Plant Cell* 1: 275-284.
- De Lorenzo, G., Salvi, G., Degrà, L., D'Ovidio, R. y Cervone, F. 1987. Induction of extracellular polygalacturonase and its mRNA in the phytopathogenic

- fungus *Fusarium moniliforme*. Journal of General Microbiology 133: 3365-3373.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., y Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21
- Dixon, R.A., Harrison, M.J., y Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32:479-501.
- Di Prieto, A. y Roncero, M.I.G. 1996a. Endopoligalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: purification, characterization, and production during infection of tomato plants. Phytopathology 86: 1324-1330.
- Di Prieto, A. y Roncero, M.I.G. 1996b. Purification and characterization of a exopoligalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. FEMS Microbiology Letters 145: 295-299.
- Di Prieto, A. y Roncero, M.I.G. 1996c. Purification and characterization of a pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue. Physiological and Molecular Plant Pathology 49: 177-185.
- Ebel, J. y Cosio, E.G. 1994. Elicitors of plant defense responses. Int. Rev. Cytol. 148: 1-36.
- Elias, K.S. y Schneider, R.W. 1992. Genetic diversity within and among races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* as determined by isozyme analysis. Phytopathology 82: 1421-1427
- Elias, K., Zamir, D., Lichtman-Pleban, T., y Katan, T. 1993. Population structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: restriction fragment length polymorphisms provide genetic. Evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. Molecular Plant-Microbe Interaction 6(5): 565-572.
- English, P.D., Jurale, J.B., y Albersheim, P. 1971. Host-Pathogen Interactions. II.Parameters affecting polysaccharide-degrading enzyme secretion by

- Colletotrichum lindemuthianum* grown in culture. *Plant Physiol.* 47: 1-6.
- English, P.D., Maglothlin, A., y Keegstra, K., 1972. A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiology* 49: 293-297.
- Esquerré-Tugayé, M.-T., Lafitte, C., Mazau, D. Toppan, A. y Touze, A. 1979. Cell surfaces in plant-microorganism interactions II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol.* 64: 320-326.
- Fernández, N., Patiño, B. y Vázquez, C. 1993. Pectin degrading enzymes secreted by six isolated of *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research* 97 (4): 461-466.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. y Fèvre, M. 1995. Characteritacion of a multigene family encoding an endopologalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* 29: 96-99.
- Goksoyr, J. 1988. Cellulases from *Sporocytophaga myxococcoides*. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 160. Biomass Part A Cellulose and Hemicellulose. W.A.Wood y S.T.Kellogg, eds. pags. 338-342. Academic Press Inc., London.
- González-Candelas, L., y Kolattukudy, P.E. 1992. Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI). *Journal of Bacteriology* 174(20):6343-6349.
- Grisebach, H., Börner, H., Hagmann, M.-L. Hahn, M.G., Leube, J. y Moesta. 1985. Induction of glyceollin biosynthesis in soybeans. En: *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. J.L. Key y T. Kosuge, eds. pags. 275-290. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Guevara, M.A., González-Jaén, M.T. y Estévez P. 1996. Pectin lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: purification and characterization. En: *Pectins and Pectinases. Proceedings of an*



- International Symposium, Wageningen, The Netherlands. J. Visser and A.G.J. Voragen, eds., pags. 747-760. Elsevier Science B.V.. Amsterdam.
- Guo, W.J., González-Candelas, L. y Kolattukudy, P.E. 1995a. Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bacteriology* 177(24): 7070-7077.
- Guo, W.J., González-Candelas, L. y Kolattukudy, P.E. 1995b. Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 323: 352-360.
- Guo, W.J., González-Candelas, L. y Kolattukudy, P.E. 1996. Identification of a novel *pelD* gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 332(2): 305-312.
- Gysler, C., Harmsen, J.A.M., Kester, H.C.M., Visser, J., y Heim, J., 1990. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. *Gene* 89: 101-108.
- Hancock, J.G. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 56: 975-979.
- Hancock, J.G. 1968. Degradation of pectic substances during pathogenesis by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. *Phytopathology* 58: 62-69.
- Hancock, J.G. 1976. Multiple forms of endo-pectate lyase formed in culture and in infected squash hypocotyls by *Hypomyces solani* f. sp. *cucurbitae*. *Phytopathology* 66: 40-45.
- Harmse J.M.A., Kuster-van Someren, M.A., Visser, J. 1990. Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene

- (*pelA*): Indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. *Curr. Genet.* 18: 161-166.
- Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M.-B., Eriksson, A., Mäe, A., Kõiv, V., y Palva, E. T. 1995. Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 8(2): 207-217.
- Heffron, S., Henrissat, B., Yoder, M.D., Lietzke, S., y Journak, F. 1995. Structure-based multiple alignment of extracellular pectate lyase sequences. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8(2): 331-334.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Reverchon, S., Nasser, W., Condemine, G., y Robert-Baudouy, J. 1996. Regulation in pectinase biosynthesis in *Erwinia chrysanthemi*. En: *Pectins and Pectinases. Proceedings of an International Symposium, Wageningen, The Netherlands.* J. Visser and A.G.J. Voragen, eds., pags. 311-330. Elsevier Science B.V.. Amsterdam.
- Hsu, S.C. y Lockwood, J.L. 1973. Chlamydospore formation in *Fusarium* in sterile salt solutions. *Phytopathology* 63: 597-602.
- Hsu, S.C. y Vaughn, R.H. 1969. Production and catabolite repression of the constitutive poligalacturonic acid *trans*-eliminase of *Aeromonas liquefaciens*. *J. Bacteriol.* 98 (1): 172-181.
- Jarvis, W.R. y Shoemaker, R.A. 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology* 68: 1679-1680.
- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1981. *Fusarium*-incited diseases of tomato and potato and their control. En: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.* P.E. Nelson, T.A. Toussoun y R.J. Cook, eds., pags. 157-168. Pennsylvania State University Press.
- Jones, J.B., Stall, R.E. y Zitter, T.A. 1991. *Compendium of tomato diseases.* APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Katan, T., Zamir, D., Sarfatti, M. y Katan, J. 1991. Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*.

- Phytopathology 81 (3): 255-262.
- Keen, N.T., y Tamaki, S. 1986. Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 168(2): 595-606.
- Keon, J.P.R. and Waksman, G. 1990. Common amino acid domain among endopoligalacturonases of ascomycete fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (8): 2522-2528.
- Knogge, W. 1996. Fungal infection of plants. *The plant cell* 8: 1711-1722.
- Kuninaga, S. y Yokosawa, R. 1991. Determination of the taxonomic status of tomato crown and root rot isolates in *Fusarium oxysporum* by DNA homology. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 57: 9-16.
- Kuster-van Someren, M.A., Flipphi, M., de Graaff, L., van den Broeck H., Kester, H., Hinnen, A., y Visser, J. 1992. Characterization of the *Aspergillus niger pelB* gene: structure and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet.* 234: 113-120.
- Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G. y Albersheim, P. 1985. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary walls of plants. *Carbohydr. Res.* 137: 111-125.
- Leary J.V. y Endo, R.M. 1971. A fusarium-induced root rot of staked tomatoes. (Abstr.) *Phytopathology* 61: 900.
- Liao, C.-H. 1989. Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1677-1683.
- Liao, C.-H, McCallus, D.E., y Wells, J.M. 1993. Calcium-dependent pectate lyase production in the soft-rotting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 83: 813-818.
- Liao, C.-H., Gaffney, T.D., Bradley, S.P., y Wong, L.-J. 1996. Cloning of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and comparison of its sequence relationship with *pel* genes of soft-rot *Erwinia*

- and *Pseudomonas*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 9(1): 14-21.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Magasanik, B. 1961. Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 26: 249-256.
- Massee, G. 1895. The "sleepy disease" of tomatoes. *Gard. Chron., Ser. 3* 17:707-708.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. y Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53:625-663
- Migheli, Q., Berio, T., y Gullino, L. 1993. Electrophoretic karyotypes of *Fusarium* spp. *Experimental Mycology* 17: 329-337.
- Mullen, J.M. y Bateman, D.F. 1971. Production of an endo-polygalacturonate *trans*-eliminase by a potato dry-rot pathogen, *Fusarium roseum* 'Avenaceum' in culture and in diseased tissue. *Physiological Plant Pathology* 1: 363-373.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380.
- Nikaidou, N., Kamio, Y., y Izaki, K. 1993. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectate lyase gene from *Pseudomonas marginalis* N6301. *Bios. Biotech. Biochem.* 57(6): 957-960 .
- Nikaidou, N., Naganuma, T., Kamio, Y., y Izaki, K. 1995. Production, purification, and properties of a pectin lyase from *Pseudomonas marginalis* N6301. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(2): 323-324.
- Oliver, R. y Osbourn, A. 1995. Molecular dissection of fungal phytopathogenicity. *Microbiology* 141: 1-9.
- Parini, C., Fortina, M.G. y Manachini, P.L. 1988. Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Journal of Applied*

- Bacteriology 65: 477-481.
- Patiño, B., Posada, M.L., González-Jaén, M.T., Martínez, M.J. y Vázquez, C. 1996. Regulation of polygalacturonase in two isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL). En: Pectins and Pectinases. Proceedings of an International Symposium, Wageningen, The Netherlands. J.Visser and A.G.J. Voragen, eds., pags. 881-891. Elsevier Science B.V.. Amsterdam.
- Patiño, B., Posada, M.L., González-Jaén, M.T., Martínez, M.J. y Vázquez, C. (en preparación). Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. .
- Pitt, D. 1988. Pectin lyase from *Phoma medicaginos* var. *pinodella*. En: Methods in Enzymology. Vol. 161. Biomass Part B Lignin, Pectin, and Chitin. W.A.Wood y S.T.Kellogg, eds. pags. 350-354. Academic Press Inc., London.
- Posada, M.L., Patiño, B., Muñoz, M.C., Vazquez, C., y González-Jaen, M.T. 1996. Caracterización bioquímica y genética de poligalacturonasas en siete especies de *Fusarium* asociadas a *Pinus pinea*. VII Congreso de la Sociedad Española de Fisiopatología.Cordoba Septiembre 1996.
- Rexová-Benková, L., y Markovic, O. 1976. Pectic enzymes. Advances in Carb. Chem. and Biochem. 33:323-385.
- Reymond, P., Deléage, G., Rascle, C., y Fèvre, M. 1994. Cloning and sequence analysis of a pologalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Gene 146: 233-237.
- Ryan, C.A., Bishop, P., Walker-Simmons, M., Brown, W.E. y Graham, 1985. Pectic fragments regulate the expression of proteinase inhibitor genes in plants. En: Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. J.L. Key y T. Kosuge, eds. pags. 319-334. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Rowe, R.C., Farley, J.D. y Coplin, D.L. 1977. Airborne spore dispersal and recolonization of steamed soil by *Fusarium oxysporum* in

- tomatogreenhouses. *Phytopathology* 67: 1513-1517.
- Sadava, D., Walker, F. y Chrispeels, M.J. 1973. Hydroxy-proline-rich cell wall protein (extensin): biosynthesis and accumulation in growing pea epicotyls. *Dev. Biol.* 30: 42-48.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez, L.E., Endo, R.M. y Leary, J.V. 1975. A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing root-rot of tomato. *Phytopathology* 65: 726-727.
- Sato R. y Araki T. 1974. On the tomato root-rot disease occurring under vinyl-house conditions in southern Hokkaido. *Annu Rep Soc Plant Protect N Japan* 25:5-13
- Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Cervone, F., Y Walton, J.D. 1990. Endopoligalacturonase is a not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *The Plant Cell*. 2: 1191-1200.
- Schlemmer, A.F., Ware, C.F., y Keen, N.T. 1987. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. *Journal of Bacteriology*. 169(10): 4493-4498.
- Showalter, A.M. 1993, Structure and function of Plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5: 9-23.
- Silva, D.O., Attwood, M.M. y Tempest, D.W. 1993. Partial purification and properties of a pectin lyase from *Penicillium expansum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 574-578.
- Snyder, W. C. y Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27: 64-67
- Somogyi, M.M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23.
- Tamaki, S.J., Gold, S., Robeson, M., Manulis, S. y Keen, N.T. 1988. Structure

- and organization of the *pel* genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Journal of Bacteriology* 170: 3468-3478.
- Tello, J.C. y Lacasa, A. 1988. La podredumbre del cuello y de las raíces, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 14: 307-312.
- Tierney, M.L., Wiechart, J. y Pluymers, D. 1988. Analysis of expression of extensin and p-33-related cell wall proteins in carrot and soybean. *Mol. Gen Genet.* 211: 393-399.
- Vázquez, C., Patiño, B., y Martínez, M.J. 1993. Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *FEMS. Microbiology Letters* 119: 191-196.
- Vakalounakis, D.J. 1988. The genetic analysis of resistance to fusarium crown and root rot of tomato. *Plant Pathology* 37: 71-73.
- Varner, J.E. y Taylor, R. 1989. New ways to look at the architecture of plant cell walls. *Plant Physiol.* 91: 31-33.
- West, C.A., Moesta, P., Jin, D.F., Lois, A.F. y Wickham, K.A. 1985. The role of pectic fragments of the plants cell wall in the response to biological stress. En: *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. J.L. Key y T. Kosuge, eds. pags. 319-334. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Willick, G.E. y Seligy, V.L. 1995. Multiplicity in cellulases of *Schizopyllum commune*. Derivation partly from heterogeneity in transcription and glycosilation. *Eur. J. Biochem.* 151: 89-96.
- Yamamoto, I., Komada, H., Kuniyasu, K., Saito, M. y Ezuka, A. 1974. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato. *Proc. Kansai Plant Prot. Soc.* 16: 17-29.
- Yoder, M.D., Keen, N.T., Jurnak, F. 1993. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secret plant virulence factor. *Science* 260: 1503-1507
- Zarra, I. y Revilla, G. 1993. Pared celular. Estructura y función. En : *Fisiología*

y bioquímica vegetal". J. Azcón-Bieto y M. Talón, eds. pags. 1-24.  
Interamericana. Mc. Graw-Hill. Madrid.