

**Aplicaciones biotecnológicas del gen *afp* (Antifungal Protein)
de *Aspergillus giganteus* para la protección de plantas frente
a infección por patógenos**

Memoria presentada por:

Ana Beatriz Moreno Gonçalves

Para optar al grado de doctor en Biotecnología

Trabajo realizado bajo la dirección de la
Dra. Blanca San Segundo de los Mozos
en el IBMB-CSIC de Barcelona

Dra. Blanca San Segundo

Ana Beatriz Moreno Gonçalves

Dra. Montserrat Busquets
Tutora del Dept. de
Bioquímica y Biol. Molecular

Barcelona, 2006

*"Que el conocimiento y la verdad lleguen a todos
y estén por encima de las creencias difundidas
por intereses políticos y económicos"*

Agradecimientos

Sin la ayuda, el apoyo y sobretodo la amistad que recibí durante estos años, habría sido casi imposible realizar esta tesis. Por eso, quiero agradecer a todos los que hayan contribuido con su granito de arena, y si me olvido alguien, es que me hago mayor...

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Blanca San Segundo por haberme dado la oportunidad de pertenecer al "laboratorio Rosa", dónde crecí mucho estos años, tanto a nivel científico como personal. Muchas gracias por toda la experiencia transmitida y por haber estado siempre presente.

Quiero dar las gracias también a la Dra. Montserrat Busquets por su tutoría en esta tesis.

Gracias a las Dras. Joaquina Messeguer y Gisela Peñas por haber producido y cuidado con tanta dedicación las plantas de arroz transgénicas en el IRTA de Cabriels. También quisiera agradecer la colaboración del Dr. Álvaro Martínez del Pozo (Univ. Complutense de Madrid) con la purificación de la proteína AFP, y de la Dra. Marisé Borja (Promiva, Madrid) con las plantas ornamentales.

Muchísimas gracias a la Dra. Pilar Fontanet y a todo el equipo del invernadero del IBMB de Barcelona (Alejandro, Eva, Leire, Maika) por haber hecho siempre lo posible y lo imposible para cuidar las plantas, además de los buenos momentos compartidos entre semilla y semilla!

Gracias a Enric Castells por haberme enseñado todo lo que sé de cómo trabajar con células humanas.

Maite y Luis ¿Que sería del departamento sin vosotros? Muchas gracias por todo! Gracias también a Ángel y su constante apoyo informático, a Mónica de microscopía, a Mercè y Mireia que tantas secuencias de DNA me hicieron y en general a todos los servicios del Instituto.

A Mina muchas gracias no solo por tu trabajo de hormiguita, casi imperceptible, pero indispensable, pero también por todo el cariño, el afecto y los buenos momentos compartidos.

Al informático más eficiente de los últimos tiempos en el IBMB: Raúl Margeli. Gracias por resolver nuestras "averías" en tiempo récord y por dejar los ordenadores perfectos. A parte de todo eso, y más importante, gracias por los buenos momentos y por ser tan compañero y leal.

Gracias a todos los compañeros del arco-iris del Departamento de Genética Molecular, siempre dispuestos a ayudar, sin los cuales esta tesis hubiera tardado al menos 10 años! Allá voy: Jaume Martínez, Irma, Jordi Bou, Céline, Salo, Mariana, Marta Boter, Ashraf, Jumana, Lola, Marga, Carmen Romera, Pau, Marc, Eli, Inma, Blanca, Víctor, Amparo, Hans, Carles, Matilda, Ana Paula, Alicia, Sami, Cristina, Lorenzo, Eva, Adela, Vicky, Claudia, Dimos, Cristian, Nuria, Carlos V, Torben, Miriam, Valeria, Silvia, Inma, David, Fatty, Pep, Néstor, Enric, Céline Loot, Soraya, Cristina, Maida, Juanjo, Paula, Nahuel, Paloma, Sergi y Mariano. También a los chicos de Torné, a los "cucarachos", y a Desi y los "fruitis".

Me gustaría agradecer de forma especial al lab. Amarillo: a Laura, por todo su apoyo "logístico" y amistad, y también a Eli, Eva y Maria José, por que casi somos dos laboratorios en uno! Gracias por todo!!!!

Y qué decir del laboratorio Rosa??? Gracias a los que ya no están, pero no menos importantes: Laura Vila, por haberme iniciado en el fantástico mundo de "Super Magna" y por todos sus sabios consejos, Mar por su increíble "know how" en técnicas de biología molecular y por su compañerismo, Isa que lo sabia todo siempre, Tini por su buen humor constante (TiniChin nos espera!), Noli por su creatividad, alegría y amistad, y también Ángels, Jaume y Cristina C.

A los que están ahora, casi se puede considerar una familia, y será imposible olvidar todo lo que vivimos juntos. Muchas gracias por todos estos años de altruismo y de ayudas

incondicionales, que me han hecho avanzar como investigadora, y crecer como persona. A mi Pequeña Musiquín, mi media naranja, siempre cómplice en todos los momentos, no hace falta ni hablar! Muchas gracias por tu amistad y cariño! Y ánimo que todo va a acabar bien! Lo mismo le digo a Jordini. Todo llega! A ti gracias por tantos buenos momentos, por tu amistad y por las clases de catalán! Gracias a Silvia, la "despistada" por su alegría de vivir y por estar siempre bien informada de todo. A la dulce Bea, siempre contenta y con sus saltitos. A María gracias por la experiencia y los buenos momentos. Jorge, gracias por tu felicidad constante, y por tus salidas creativas e inesperadas, capaces de animar a cualquiera en los peores momentos! A Lidi, gracias por ser tan alegre y divertida, y por tener el toque de "seriedad" que creo que hace falta en el lab!! A Eudalilla por ser un discípulo al mismo tiempo rebelde y obediente! Pero en todo caso eficiente!!! Gracias también por tu catalán! Y a la última incorporación del lab, Emmanuel, te deseo suerte y que pases tan buenos momentos como yo! Gracias a todos!! (también por tanta paciencia en las comidas!!!)

Quiero agradecer también a todos mis amigos que conocí aquí en Barcelona, y también a los que dejé en Brasil.

También a mi familia, que me ha apoyado siempre en todos los momentos. A mi madre, mi padre, mi gori gori, mis hermanos (Laura (y Paulo!), Felipe, Juan, Víctor). También a mis abuelos, tanto de aquí como mi abuela de Brasil.

Y finalmente, gracias a Patrik, por darme ánimo y fuerza cuando ya no sabía de dónde sacarlos, y por estar siempre a mi lado. Gracias por todo!

Índice	i
Abreviaturas	v
Resumen general	1
Introducción	5
1- Agricultura: la revolución verde y la revolución biotecnológica	5
2- El cultivo del arroz	9
2.1 La piriculariosis	11
3- Plantas ornamentales: el geranio	15
3.1 La podredumbre gris del geranio	16
4- Mecanismos de defensa en plantas	18
4.1 Las proteínas PR (<u>P</u> athogenesis <u>R</u> elated Proteins)	22
4.2 Respuestas de defensa sistémicas	30
4.3 Los genes <i>PRms</i> , <i>mpi</i> y <i>ZmPR4</i> de maíz	34
4.4 Otras proteínas antimicrobianas de plantas	36
5- Proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana de origen no vegetal	40
5.1 Proteínas antimicrobianas producidas por microorganismos del suelo	45
5.2 La proteína AFP (<u>A</u> ntifungal <u>P</u> rotein) de <i>Aspergillus giganteus</i>	47
6- Plantas transgénicas resistentes a patógenos	49
Objetivos	55
Material y Métodos	57
I- Material	
1- Material Biológico	57
1.1 Bacterias	57
1.2 Hongos	57
1.3 Plantas	57
1.4 Plásmidos	57
2- Medios de cultivo	
2.1 Bacterias	57
2.2 Hongos	58
2.3 Plantas	58
3- Tampones y Soluciones	60
II- Métodos	
1- Relacionados con bacterias y ácidos nucleicos	
1.1 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	62
1.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	63
1.3 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> a gran escala	63
1.4 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala ("mini prep")	63

Índice

1.5 Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
1.6 Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	65
1.7 Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> a pequeña escala	65
1.8 Extracción de DNA genómico de <i>Oryza sativa</i> y <i>Magnaporthe grisea</i>	65
1.9 Extracción de RNA total de <i>Oryza sativa</i>	66
1.10 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	68
1.11 Reacciones de modificación de DNA: digestión, defosforilación y ligación	68
1.12 Transferencia de DNA (<i>Southern Blot</i>) e hibridación con sondas radioactivas	68
1.12.1 Transferencia de DNA a membrana de nylon	68
1.12.2 Marcaje y purificación de sondas radioactivas	69
1.12.3 Hibridación	69
1.13 Transferencia de RNA (<i>Nothern Blot</i>) e hibridación con sondas radioactivas	70
1.13.1 Electroforesis en gel desnaturizante de RNA	70
1.13.2 Transferencia de RNA a membrana de nylon	71
1.13.3 Marcaje y purificación de sondas radioactivas	71
1.13.4 Hibridación	71
2- Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (<i>gusA</i>)	72
2.1 Protocolo de procesamiento del material vegetal para la detección de la actividad de la β -glucuronidasa	74
3- Obtención de la proteína AFP de <i>Aspergillus giganteus</i>	74
4- Estudios con hongos	
4.1 Obtención de esporas de los hongos <i>Magnaporthe grisea</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	74
4.2 Determinación de la actividad antifúngica de la proteína AFP <i>in vitro</i>	75
4.3 Tinción con azul de lactofenol	
4.3.1 En ensayos <i>in vitro</i>	75
4.3.2 En ensayos <i>in vivo</i>	76
4.4 Determinación de la actividad antifúngica de la proteína AFP frente a <i>Botrytis cinerea in vivo</i>	76
4.5 Ensayo de inhibición de la germinación de esporas	76
4.6 Ensayo de determinación de actividad fungistática o fungicida de AFP	77
4.7 Ensayo con los colorantes sytox green y congo red en cultivos de Hongos	77

4.8 Obtención de elicitores de hongos	77
4.9 Marcaje de AFP con el fluorocromo Alexa 568	78
4.10 Ensayos de unión de la proteína AFP a ácidos nucleicos	78
4.11 Actividad ribonucleásica de la proteína α -sarcina frente a reticulocitos de conejo	78
4.12 Microscopía electrónica de transmisión	80
5- Estudios con células humanas	
5.1 Tratamiento de células humanas (HeLa) con AFP	81
5.1.1 Conservación del <i>stock</i> de células	81
5.1.2 Mantenimiento de las células	82
5.1.3 Tratamiento de células HeLa con AFP y tinción con el colorante sytox green	83
6- Estudios con plantas	
6.1 Tratamiento de protoplastos de arroz con AFP	84
6.1.1 Obtención de protoplastos de arroz	
6.1.1.1. Esterilización de semillas de arroz	84
6.1.1.2 Obtención de protoplastos de arroz	84
6.1.2 Tratamiento de protoplastos de arroz con AFP y tinción con el colorante sytox green	85
6.2 Transformación de plantas de arroz	
6.2.1 Obtención de callos embriogénicos a partir del escutelo del embrión zigótico maduro	85
6.2.2 Transformación por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	86
6.2.3 Transformación por biolística	88
6.2.4 Medios de cultivo	89
7- Ensayos de resistencia de plantas de arroz transgénicas expresando el gen <i>afp</i> frente a la infección por <i>Magnaporthe grisea</i>	90
7.1 Ensayo en hoja cortada	90
7.2 Ensayo en planta entera	91
Resultados	
Capítulo I: "Activity of the antifungal protein from <i>Aspergillus giganteus</i> against <i>Botrytis cinerea</i> "	93
Capítulo II: " Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from <i>Aspergillus giganteus</i> confers resistance to the blast fungus <i>Magnaporthe grisea</i> "	105
Capítulo III: "Antifungal mechanism of the <i>Aspergillus giganteus</i> AFP protein against the rice blast fungus <i>Magnaporthe grisea</i> "	121

Índice

Discusión	151
Conclusiones	165
Referencias Bibliográficas	167

Abreviaturas

2-4D	ácido diclorofenoxiacético
aa	aminoácido
ABA	ácido abscísico
AIA	ácido indolacético
Amp	ampicilina
BA	benzil-amino-purina
BSA	albúmina sérica bovina
cv.	cultivar
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Kan.	Kanamicina
kDa	kilodalton
KeV	kilo-electrón-voltio
LB	Luria Bertani
M	molaridad
Mb	megabases
mM	milimolar
mg	miligramo
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
N	normalidad
nt	nucleótidos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
pv.	patovar
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
TMV	virus del mosaico del tabaco
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
var.	variedad

Las plantas están constantemente sometidas a diferentes estreses ambientales, ya sean de tipo abiótico, como alteraciones de temperatura o disponibilidad de agua, o de tipo biótico, como son las agresiones por microorganismos del entorno. Los hongos causan un gran número de enfermedades en las plantas, siendo responsables de grandes pérdidas económicas en las plantas cultivadas en campo o en invernadero. Actualmente, el control de las enfermedades causadas por hongos se realiza mediante la utilización masiva de compuestos químicos, con el impacto negativo que su uso tiene en el medio ambiente, y en la salud humana y animal.

Una alternativa al control químico de las enfermedades en plantas es la obtención de plantas transgénicas resistentes a hongos fitopatógenos. El rápido desarrollo que se ha observado en los campos de la biología y genética molecular, así como en el cultivo *in vitro* y transformación de especies vegetales, ha permitido generar plantas transgénicas para diferentes especies de interés agronómico que presentan resistencia frente a hongos. En un principio, la mayoría de los transgenes utilizados para este fin provenían de las propias plantas, genes que codifican proteínas o péptidos antifúngicos que participan en sus respuestas de defensa. Actualmente, y dada la reducida efectividad de esta estrategia, se está trabajando en la identificación de genes de defensa de otros organismos, como son bacterias, insectos, animales e incluso otros hongos, para ser utilizados en la transformación de plantas. La utilización de un gen de origen bacteriano, el gen *Bt* de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*, es uno de los que mejor ilustra la utilidad de este tipo de genes para la obtención de resistencia en plantas transgénicas, en este caso de resistencia frente al ataque por insectos plaga.

En este trabajo se ha evaluado la utilidad de la proteína AFP (antifungal protein), producida por el hongo del suelo *Aspergillus giganteus*, para actuar como agente antifúngico frente a fitopatógenos de plantas, más concretamente geranio y arroz. La proteína AFP es una proteína pequeña con una estructura compacta y muy básica, que se secreta al espacio extracelular. Estudios anteriores habían demostrado su actividad antifúngica frente a diversos fitopatógenos (Lacadena *et al*, 1995; Vila *et al*, 2001). Así, el primer objetivo de esta tesis fue estudiar si esta proteína presentaba actividad antifúngica frente al hongo *Botrytis cinerea*. Este hongo es el responsable de la enfermedad conocida como podredumbre gris en muchas plantas, y entre ellas las plantas ornamentales. Los resultados aquí obtenidos revelan que la proteína AFP presenta una fuerte actividad antifúngica frente a cepas de *Botrytis cinerea* aisladas a partir de plantas de geranio, inhibiendo tanto el desarrollo de las hifas como la germinación de las esporas. Cuando se utiliza en combinación con la proteína cecropina A de lepidóptero, se observa un efecto antifúngico aditivo entre

Resumen general

ambas proteínas, lo que puede ser de utilidad para el desarrollo de una estrategia de expresión simultánea de ambos genes, gen *afp* y gen *cecropina A*, en plantas transgénicas. Además, la AFP inhibe el crecimiento de *B. cinerea* tanto *in vitro* como *in vivo*, en plantas de geranio.

Por otra parte, el hongo *Magnaporthe grisea* es el responsable de la enfermedad conocida como piriculariosis en plantas de arroz. La actividad antifúngica de la proteína AFP frente a este fitopatógeno ya se había descrito anteriormente tanto *in vitro* como *in vivo* (Vila *et al*, 2001). Se sabía también que la expresión constitutiva del gen *afp* en plantas transgénicas de arroz era capaz de conferir resistencia frente a este patógeno (Coca *et al*, 2004). En este trabajo se ha desarrollado una estrategia para expresar el gen *afp* de manera controlada e inducible, evitando así los posibles efectos negativos de una expresión constitutiva, tanto a nivel de gasto metabólico por parte de la planta, como de su aceptación por el consumidor final. Los estudios realizados indicaron que el promotor de un gen de maíz que codifica una proteína PR (*pathogenesis related*), el gen *ZmPR4*, es funcional e inducible por el hongo *M. grisea* en plantas de arroz. Este promotor es capaz de controlar la expresión del gen *afp* en niveles suficientemente elevados para conferir resistencia a la infección por el hongo *Magnaporthe grisea* en plantas transgénicas. Su utilización tiene una ventaja adicional ya que este promotor no es activo en el endospermo de la semilla del arroz (órgano destinado al consumo), con lo que se evita que el producto del transgén se acumule en este tejido.

Finalmente, dado el gran potencial del gen *afp* para aplicación biotecnológica, se hacía necesario determinar su mecanismo de acción frente a hongos, así como sus posibles efectos sobre células animales o vegetales. En este sentido, en la última parte de esta tesis, se han realizado diferentes estudios empleando como modelo el hongo *M. grisea*. Mediante microscopía confocal utilizando diferentes sistemas de marcaje fluorescente, y microscopía electrónica de transmisión, se ha podido observar que la proteína AFP es capaz de formar poros en la membrana del hongo. La proteína AFP penetra en la célula del hongo y se acumula en el núcleo. Además, tiene la propiedad de interactuar con ácidos nucleicos, ya sea DNA o RNA. Estos resultados llevan a pensar que el mecanismo de acción de esta proteína se basa en una combinación de actividades, primero por la formación de poros en la membrana permitiendo su entrada, seguida de la interacción con ácidos nucleicos, llevando a la muerte celular. Se realizaron también ensayos con células vegetales (protoplastos de arroz) y humanas (células HeLa), que han permitido determinar que la proteína AFP no ejerce ningún efecto nocivo significativo en estas células.

Resumen general

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el gen *afp* es un buen candidato para ser utilizado como transgén para la protección de plantas de geranio y de arroz frente a enfermedades producidas por los hongos *Botrytis cinerea* y *Magnaporthe grisea*, respectivamente. El promotor del gen *ZmPR4* representa asimismo una buena opción para dirigir la expresión de genes antifúngicos en plantas transgénicas de arroz.

Resumen general

1- Agricultura: la revolución verde y la revolución biotecnológica

La utilización de las plantas de manera sistemática y controlada con la finalidad de obtener alimentos tanto para consumo humano como animal, tuvo su inicio hace unos 10.000 años. A escala mundial, el 88% de las calorías y el 90% de las proteínas de la alimentación humana proceden directamente de los vegetales. De éstos, los cereales son, sin duda, el grupo de plantas de mayor importancia (www.jardibotanic.org/utiles).

En los años 50, surgió en Méjico un movimiento impulsado por el profesor Norman Borlaug (premio Nóbel de la paz en 1970) que más tarde se propagó por todo el mundo. Este movimiento se denominó Revolución Verde, y tuvo como principal objetivo aumentar la producción agrícola con la finalidad de disminuir el hambre en el mundo. Si a principios de la década de 50 el mundo producía cerca de 14 millones de toneladas de comida, se pasó a 144 millones de toneladas en 1990. El gran impulso que tuvo la agricultura durante la revolución verde se basaba en cuatro pilares fundamentales: a) la utilización de variedades mejoradas genéticamente mediante entrecruzamiento; b) la utilización de fertilizantes y pesticidas; c) la irrigación; d) el empleo de maquinaria agrícola y no de fuerza humana o animal (Parks, W. 1998). Como consecuencia de la implantación de estas técnicas, la producción de alimentos aumentó de manera muy importante en 30 años, aunque el hambre solo logró bajar un 20%. Esto se debió en gran parte a los problemas de distribución y almacenamiento de la comida, y a la inaccesibilidad de los pequeños agricultores a las nuevas técnicas de cultivo y a los productos químicos que les permitirían aumentar su producción. Aunque la revolución verde tuvo un impacto importante en la agricultura y en la producción de alimentos, también vino a generar nuevos problemas, tales como el uso extensivo de monocultivos, el aumento en los costes de producción, sin olvidar los efectos negativos que estas prácticas provocaban en el medio ambiente. Por ejemplo, se produjo una importante salinización de la tierra, erosión del suelo, agotamiento de las fuentes de agua y de los nutrientes del suelo, y la aparición de especies resistentes a los pesticidas. Además, en la actualidad se observa que mientras la población mundial sigue creciendo, las tasas de producción agrícola empiezan a bajar. Se pierden cada vez más zonas cultivables a causa de la expansión de las ciudades (Parks, W. 1998).

Al inicio del proceso de domesticación de las plantas se aplicaban técnicas de genética clásica para la obtención de nuevas variedades mejoradas genéticamente. Hay que decir que el entrecruzamiento de especies vegetales ha resultado de gran utilidad para la obtención de nuevas variedades. De hecho, la mayoría de las plantas cultivadas actualmente son el resultado de varios procesos de entrecruzamiento y selección de características agronómicas de interés. En este proceso se produce un intercambio de material genético al azar entre ambas variedades, lo que permite la obtención de variedades genéticamente

Introducción

nuevas. Sin embargo, éste es un proceso lento y restringido a especies sexualmente compatibles, y que además es poco específico ya que el entrecruzamiento conlleva un intercambio masivo e incontrolado de material genético. El desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para diferentes especies de plantas ha permitido asimismo grandes avances en el campo de la genética vegetal (Dale, 1999).

Con la aparición de la teoría de la evolución de Charles Darwin en 1859 y los estudios de Gregor Mendel en 1869 sobre la transmisión de caracteres de padres a hijos, el DNA empezó a ganar un papel importante en el ámbito de la genética. La tabla 1 presenta algunos de los hitos científicos más relevantes en esta área.

Tabla 1: Algunos de los eventos en el campo de la genética y de la biología molecular con mayor impacto en la biotecnología vegetal. Adaptado de Moore, 2003.

1910	Thomas H. Morgan demuestra que los genes están en los cromosomas. Aparece el término " Biotecnología "
1921	M. Molliard cultiva embriones de plantas <i>in vitro</i>
1938	Estudios sobre proteínas y DNA por cristalografía de rayos X. Aparece el término " Biología Molecular "
1946	E. Ball produce la primera planta entera a partir de cultivos de meristemos apicales
1950	Morel obtiene los primeros cultivos <i>in vitro</i> de una monocotiledónea utilizando leche de coco; Edwin Chargaff determina que siempre existe una relación de 1:1 de adenina y de timina en el DNA de los diferentes organismos
1953	James Watson y Francis Crick identifican la estructura en doble hélice del DNA
1958	Maheshwari y Rangaswamy regeneran embriones somáticos <i>in vitro</i> a partir de núcleos de óvulos de <i>Citrus</i> ; Coenbergen descubre la DNA polimerasa
1962	Murashige y Skoog desarrollan un medio para el cultivo <i>in vitro</i> de plantas
1965	Vasil y Hidebrant regeneran plantas de tabaco a partir de células individuales
1970	Smith descubre la primera endonucleasa de restricción de <i>Haemophilus influenzae</i> (<i>HindI</i>)
1973	Herbert Boyer y Stanley Cohen insertan un gen de un sapo africano en el DNA plasmídico de una bacteria: primer organismo recombinante . Empieza la ingeniería genética
1977	Maxam y Gilbert desarrollan un método para secuenciar el DNA
1979	Marton y colaboradores desarrollan un proceso de cocultivo para transformación de protoplastos con <i>Agrobacterium</i>
1983	Kary Mullis desarrolla la idea de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de <i>polymerase chain reaction</i>), un proceso de amplificación química de DNA. Marc Van Montagu y Jeff Shell producen las primeras plantas transgénicas : tabaco resistente a kanamicina y a methotrexate (una droga usada en el tratamiento del cáncer y de la

Introducción

	artritis). Transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . En el mismo año se producen también plantas de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> resistentes a kanamicina (Framond, A J. y colaboradores); petunia resistente a kanamicina (Fraley, R. T. y colaboradores); y girasol expresando el gen faseolina de judía (Murai, N. y colaboradores)
1987	Sanford, J. C. y Klein T. M. desarrollan un método transferencia de DNA para transformación de plantas basado en el bombardeo de las células con partículas de oro o tungsteno recubiertas de DNA. Barton y colaboradores aíslan el gen <i>Bt</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Bytebier y colaboradores transforman por primera vez una monocotiledónea (espárrago) con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
2000	Se completa la secuenciación del genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>
2002	Se completa la secuenciación del genoma del arroz
2003	El 64% de la soja y el 34% del maíz que se producen en los EUA son transgénicos

Desde 1983, cuando se obtuvieron por primera vez plantas transgénicas, la ingeniería genética vegetal ha progresado continuamente en la línea de la obtención de plantas mejoradas en diversos aspectos. Así, se han obtenido logros importantes en la resistencia a enfermedades y plagas; modificaciones en la maduración de frutos; modificaciones en el contenido de grasa, almidón y proteína; tolerancia a herbicidas; resistencia a estreses ambientales (temperatura, sequía y salinidad); alteraciones en el tamaño y tiempo de floración; aumento en la producción de vitaminas y minerales; eliminación de productos alergénicos, y producción de fármacos (Grover y Gowthaman, 2003; Rommens *et al*, 2004; Dixon, 2005; Ma *et al*, 2005).

Debido a su enorme potencial, la biotecnología vegetal ha venido a representar una segunda revolución en la agricultura y en la manera de producir alimentos. Entre 1996 y 2004, el área destinada al cultivo de plantas transgénicas aumentó de 1,7 a 81 millones de hectáreas (fig.1).

Introducción

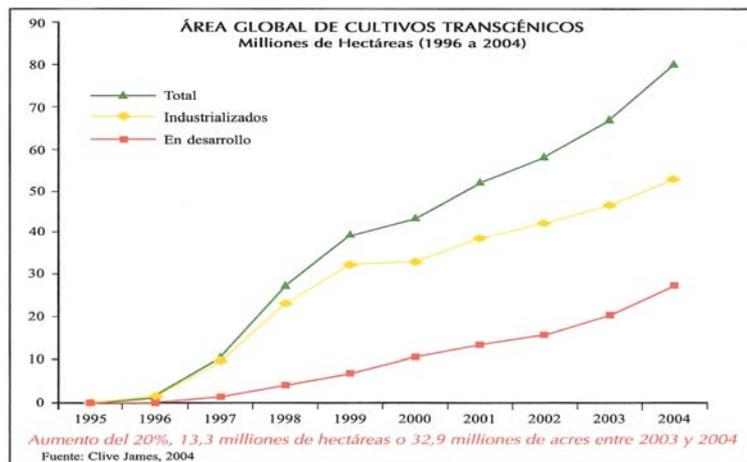


Figura 1: Área global de cultivo de plantas transgénicas de 1996 hasta 2004. Tomado de James, 2004.

Cada vez son más los países que cultivan plantas modificadas genéticamente. Además de los países industrializados, los países en vías de desarrollo también empiezan a mostrar un aumento en el cultivo de plantas transgénicas. En la figura 2 se ilustran los 17 países que actualmente cultivan plantas transgénicas. Se indican también los países donde estos cultivos han sobrepasado ya las 50.000 hectáreas de área cultivada (en 2003 eran 10 países, 14 en 2004).

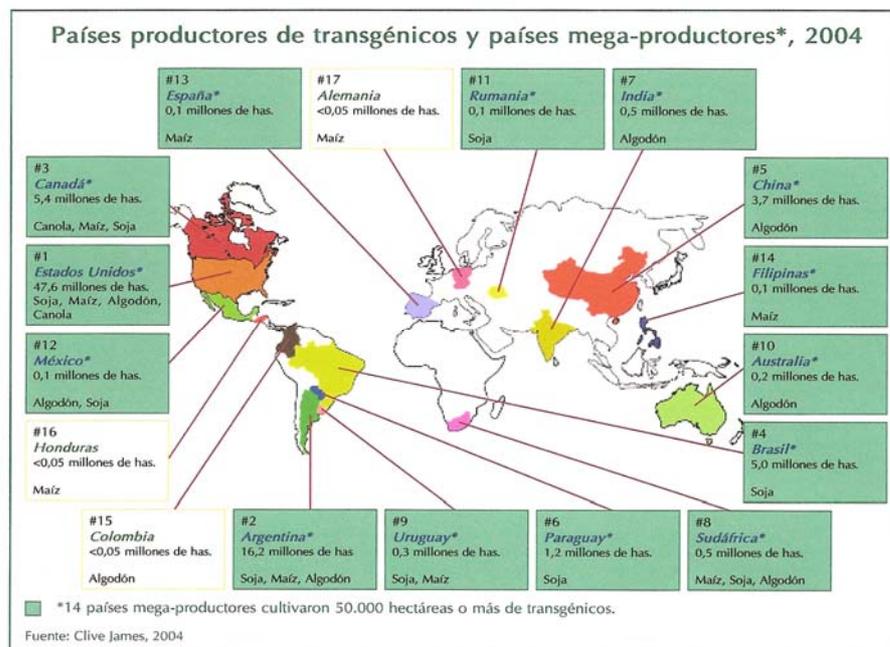


Figura 2: Países productores de cultivos transgénicos. Tomado de James, 2004

La mejora de plantas a través de biotecnología presenta una serie de ventajas fundamentales sobre la mejora genética clásica: permite introducir un único gen de función conocida en el genoma de la planta; permite introducir en una planta un gen de cualquier origen, no necesariamente de una planta de una especie relacionada; requiere mucho menos tiempo hasta la obtención de la planta con las características deseadas.

La utilización de cultivos transgénicos presenta mejoras sustanciales en la producción y un menor impacto en el medio ambiente. A ello hay que añadir una reducción de costes de producción al prescindir de tratamientos fitosanitarios. Los cuatro cultivos transgénicos de mayor importancia a nivel mundial son la soja, el maíz, el algodón y la canola, en este orden. Además de estos cultivos, hay otras plantas modificadas genéticamente, como colza, tabaco, remolacha, achicoria, patata, papaya, tomate, calabaza y arroz, entre otros. La tolerancia a herbicidas y la resistencia a insectos son las dos principales características introducidas.

2- El cultivo del arroz

El arroz es una de las especies cultivadas más antiguas de la tierra. Tuvo su origen hace unos 40 millones de años en Asia, en la región situada entre el norte de India y el sur de China (CIRAD, 2002). Así como el maíz, el trigo y el sorgo, el arroz es una monocotiledónea de la familia de las gramíneas capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Su temperatura ideal de crecimiento es de 30°C, estando la mayor parte de los cultivos en zonas tropicales. Así, el cultivo del arroz se distribuye por una amplia franja de climas, entre los 35° de latitud sur y los 50° de latitud norte (Webster y Gunnell, 1992), y se cultiva fundamentalmente en tres ecosistemas: irrigación (55% de la superficie total); seco, que depende de las lluvias (37-39% de la superficie total); y aguas profundas, siendo cultivado en lagos y ríos (6-8% de la superficie total) (Ortells, 2003). Perteneció al género *Oryza* y se cultivan dos de las 20 especies conocidas: *O. glaberrima* y *O. sativa* (Webster y Gunnell, 1992). La primera, *O. glaberrima*, es originaria del delta del río Níger en África, y tiene su cultivo restringido a esa área debido a su menor productividad. Su domesticación por el hombre se remonta a casi 4000 años. La segunda especie, *O. sativa*, es la más ampliamente cultivada en el mundo. Tiene un genoma diploide $2n=24$ y es una planta anual, aunque en zonas tropicales donde las condiciones climáticas son favorables crece como perenne (Webster y Gunnell, 1992). *O. sativa* tuvo su origen en Asia, al pie del Himalaya, y se cree que su domesticación se realizó hace 9000 años (CIRAD, 2002). Morfológicamente, la especie *O. sativa* se clasifica en tres subespecies: índica, japónica y javánica (Cheng *et al*, 2003; Ortells, 2003). La subespecie índica es propia de zonas tropicales y subtropicales; la subespecie japónica se cultiva en zonas templadas, mientras

Introducción

que la javánica se cultiva en la isla de Java. Esta última también se denomina japónica tropical ya que se demostró que pertenecen al mismo grupo varietal (Oka, 1958). En Europa las variedades más cultivadas son Senia (España y Grecia), Ariete (Italia y Francia), St. Andrea, Selenio y Vialone (Italia) que pertenecen a la subespecie japónica. Los 5 países productores de arroz más importantes de Europa son: Italia (contribuye con un 50% del total), España (con un 25%), Francia, Portugal y Grecia.

El arroz es el tercer cereal más producido en el mundo después del maíz y del trigo, y el segundo, después del trigo, usado en la alimentación. Representa el 15% de la superficie cultivada del planeta y más del 90% de la producción está en Asia (fig. 3).



Figura 3: Producción mundial de arroz (valores en toneladas/año) Tomado de Moneo, 2003.

El consumo medio de arroz es de 65 Kg por persona al año (CIRAD, 2002). En Asia, el consumo es superior a los 80 Kg, en regiones subtropicales (África y América Latina) es de entre 30 y 60 Kg, y en países industrializados (Europa y EUA) es de menos de 10 Kg (Ortells, 2003). El arroz aporta cerca de la mitad de las calorías ingeridas por más de 3000 millones de personas en Asia, donde representa un 60-70% del total de comida ingerida. Tomando la totalidad de los países en desarrollo, el arroz representa un 27% de la energía y un 20% de las proteínas ingeridas (datos de la FAO, 2005). Como cultivo agrícola produce más calorías por hectárea que el trigo (Webster y Gunnell, 1992; CIRAD, 2002). Según el IRRI (International Rice Research Institute), la producción mundial de arroz pasó de 215.655.000 toneladas en 1961 a 608.000.000 toneladas en 2004, y se estima que en 2012 llegue a 672.000.000 toneladas. Sin embargo, ese aumento en la producción no se ve reflejado en un aumento de la superficie cultivada, la cual se mantiene en aproximadamente 152 millones de hectáreas, debido en gran parte a la dificultad para aumentar las superficies irrigables y a la limitación de las áreas destinadas a la agricultura por el crecimiento de las zonas urbanizadas. Para alcanzar una mayor producción de arroz, se hace necesario introducir avances tecnológicos que permitan producir más en el mismo espacio disponible.

Durante la Revolución Verde, se produjo un aumento anual de la producción de un 2,5% como consecuencia de los cambios y mejorías introducidos en la agricultura en ese

periodo. Sin embargo, se observa que la producción desciende progresivamente (cerca de 1,1% anual). Empieza a faltar agua y las tierras cultivables así como la mano de obra son cada día más escasas. Por otra parte, las técnicas de intensificación de la producción arroceras han provocado serios daños al medio ambiente y a los recursos ambientales relacionados, como consecuencia del uso masivo de herbicidas, abonos inorgánicos y pesticidas químicos. Ello ha sido la causa fundamental del aumento de la salinidad/alcalinidad de los suelos, llevando en última instancia a producir daños en los ecosistemas. Todo ello hace necesario el desarrollo de métodos de cultivo alternativos que permitan mejorar la productividad y la calidad del arroz. La utilización de variedades genéticamente modificadas permite avanzar en esta dirección, por ejemplo, mediante la obtención y la utilización de variedades resistentes a patógenos y plagas, o de variedades con mejores propiedades nutricionales (Brookes y Barfoot, 2003).

El arroz, además de un cultivo de interés agronómico, es considerado actualmente como la planta modelo para estudios en monocotiledóneas, gracias a su reducido genoma (430Mb) y la disponibilidad de eficientes protocolos de transformación. Después de *Arabidopsis*, el arroz ha sido la segunda especie vegetal en tener su genoma secuenciado (Goff *et al*, 2002; Yu *et al*, 2002). Además se han observado grandes similitudes entre el genoma de arroz y el genoma de otros cereales, como son el trigo, el maíz o el sorgo (colinearidad en las estructuras de sus genomas) (Goff, 1999). Según el "International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications" (UK), para el año 2012, se habrán introducido en los cultivos asiáticos variedades de arroz resistentes a herbicidas, a infección por hongos y bacterias, a virus, a insectos; más tolerantes a estreses abióticos como sequía y salinidad; más productivas por alteraciones en los niveles y calidad de carbohidratos o por el mejor desarrollo de la espiga; y con mejor calidad nutricional, como producción de vitamina A, hierro, y proteínas (Brookes y Barfoot, 2003).

Actualmente, las enfermedades causadas por plagas y patógenos son una de las causas más importantes de pérdidas en las cosechas de arroz en el mundo, siendo los hongos los responsables del 20-40% (www.apsnet.org/Education/feature/FoodSecurity). Esto significa que se pierden anualmente cerca de 40 millones de toneladas.

2.1-La piriculariosis

La piriculariosis, es la enfermedad causada por el hongo *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr (estado telomorfo), o *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc (estado anamorfo). Se clasifica dentro de la división Eumycota, hongos que producen micelio, subdivisión Deuteromycotina, orden Hyphales, clase Hyphomycetes, género *Pyricularia* (Ou, 1985; Agrios, 1988).

Introducción

El hongo *Magnaporthe grisea* es el responsable de las mayores pérdidas en el cultivo de arroz a nivel mundial, estando presente en 85 países. Se estima que cada año este patógeno causa pérdidas en la productividad de arroz del orden del 11% al 30%, destruyendo una superficie de este cultivo suficiente para alimentar cerca de 60 millones de personas (datos de la National Science Foundation; y del Internacional Rice Blast Genome Consortium, www.riceblast.org). La enfermedad causada por *M. grisea* se describió por primera vez en el año de 1637 en China, con el nombre de "enfermedad de la fiebre del arroz", y actualmente se conoce como piriculariosis (o *rice blast*).

El desarrollo de esta enfermedad se ve favorecido por las condiciones de humedad elevada con poco o ningún viento y con temperaturas promedio de 17-23°C (noche), y de 25-30°C (día). Estas características se cumplen en la mayor parte de las regiones productoras de arroz, de ahí su amplia distribución y gran efecto destructivo. Además, la utilización masiva de fertilizantes en los cultivos intensivos aumenta la cantidad de nitrato en la tierra, favoreciendo la capacidad infectiva del hongo (Agrios, 1988). *M. grisea* infecta las partes aéreas de la planta, principalmente las hojas, pero se ha visto que también tiene capacidad de infectar raíces (Dufresne y Osborn, 2001; Sesma y Osborn, 2004). Los síntomas de la infección se caracterizan por lesiones en las hojas que empiezan por pequeños puntos marrones, evolucionando a manchas de forma elíptica o de diamante de hasta 2 cm de largo y 0,5 cm de ancho, con el centro gris y las extremidades rojo-amarillentas o marrones. Sin embargo, el tamaño y forma de las lesiones depende de factores ambientales, así como de la edad de la planta y su grado de susceptibilidad a la raza del patógeno (RiceBlastDB, 2001) (fig. 4).



Figura 4: Síntomas de infección por *Magnaporthe grisea* en hojas de arroz.

Las esporas (o conidios) de *M. grisea* se producen en los conidioforos y se dispersan por el aire o en pequeñas gotas de agua provenientes de plantas infectadas. Los conidios

son piriformes y biseptados, y contienen 3 células, una de las cuales presenta un pequeño apéndice, el punto de unión al conidioforo (Howard y Valent, 1996) (fig. 5).

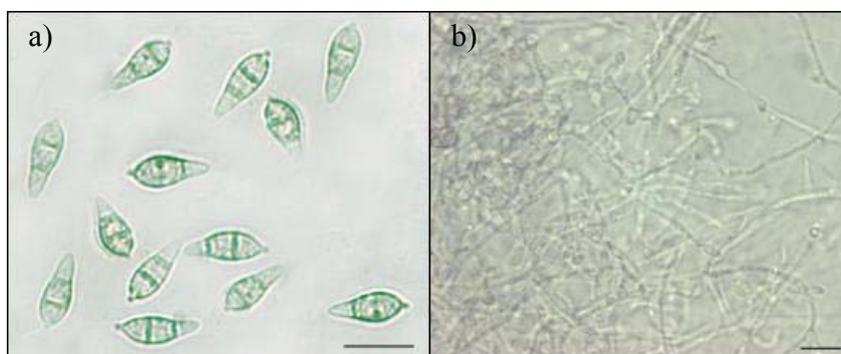


Figura 5: a) Conidios de *M. grisea*. b) Hifas de *M. grisea* crecidas en medio líquido.
Barras = 5 μm .

Los conidios germinan en condiciones de alta humedad relativa (más del 90%). El crecimiento del tubo germinativo a partir de una de las células de las extremidades es muy rápido (Bouret y Howard, 1990). Al tocar la superficie de la hoja de arroz, este tubo germinativo desarrolla en su zona apical una estructura muy rica en melanina, el apresorio (Howard y Valent, 1996; Urban *et al*, 1999). Esta estructura se encuentra en un amplio rango de especies de hongos, y también en Oomicetos, lo que sugiere que la diferenciación del apresorio es una adaptación generalizada entre microorganismos que infectan las plantas a través de la penetración de su pared celular (Xu *et al*, 1998). La presión que ejerce el apresorio gracias a la formación del gancho de penetración permite atravesar la cutícula de la planta hasta llegar a las células de la epidermis. Una vez dentro de la célula vegetal, este gancho aumenta de diámetro para formar una hifa primaria, que en seguida se diferencia en una hifa secundaria ramificada que continúa con la proliferación del micelio por todo el tejido de la hoja (Heath *et al*, 1992; Clergeot *et al*, 2001). Un esquema del ciclo de vida de *M. grisea* se puede ver en la figura 6. El patógeno puede llegar a representar un 10% de la biomasa total de una hoja infectada después de 3 días (Talbot *et al*, 1993, 2003). Éste es el tiempo necesario para que se empiecen a observar las primeras lesiones en la hoja, y también cuando se produce la esporulación y la formación de nuevos conidios en la superficie del tejido infectado. Los conidios se liberan generalmente por la noche y son dispersados principalmente por el aire infectando así otras partes de la misma planta o plantas vecinas (RiceBlastDB, 2001).

Introducción

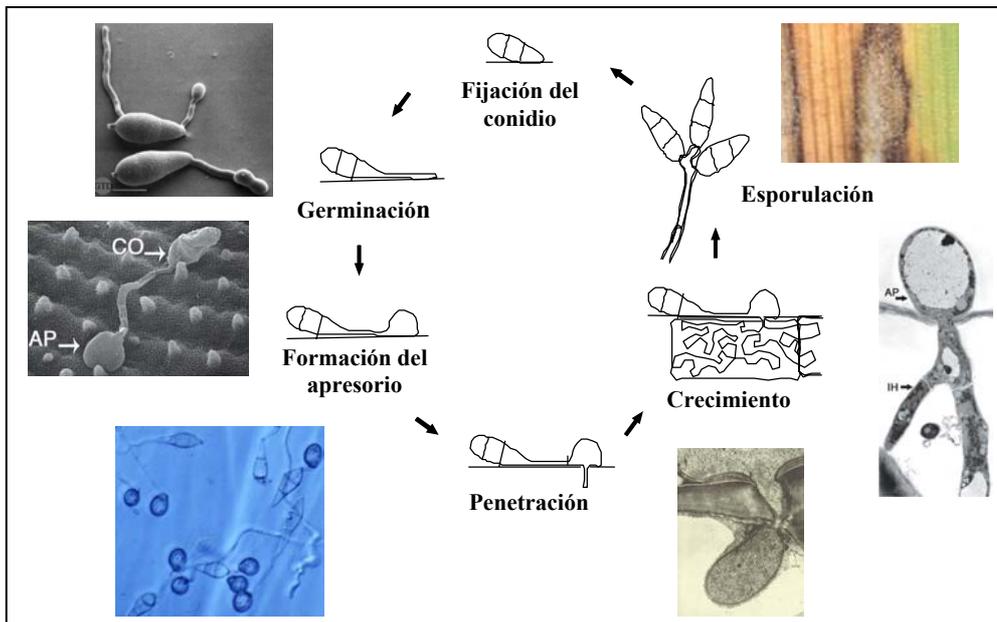


Figura 6: Esquema del ciclo de vida de *M. grisea*. (Adaptado de Dean *et al*, 2005; y www.usask.ca/biology/kaminskyj/342/lecture/B342_L15.PPT)

El control de la piriculariosis depende de la aplicación de fungicidas, en su mayoría tóxico y caros (probenazole, tricyclazole, pyroquilon y phthalide). La piriculariosis representa actualmente el mayor mercado mundial de fungicidas.

Por su enorme importancia económica, la interacción arroz-*M. grisea* representa un sistema modelo en el estudio de las interacciones planta-patógeno, y los mecanismos de infección por este hongo han sido ampliamente estudiados. Recientemente se ha descrito la proteína responsable del inicio del proceso de penetración del hongo en la hoja, etapa determinante en el establecimiento de la infección. Se trata de una quinasa MAP (Mitogen Activated-protein), esencial para la formación del apresorio (Zhao *et al*, 2005). Éstas y otras informaciones serán muy útiles para el desarrollo de estrategias para la obtención de plantas resistentes. Se ha obtenido ya la secuencia completa del genoma de *M. grisea*, con más de 11.000 genes, culminando los esfuerzos de diversos investigadores de todo el mundo (Dean *et al*, 2005). La combinación de la información genética disponible de este patógeno con la del ya publicado genoma del arroz (Goff *et al*, 2002; Yu *et al*, 2002) permitirá el estudio de esta interacción planta-patógeno a nivel molecular, ayudando a elucidar los mecanismos de infección del patógeno así como también las respuestas metabólicas y de defensa de la planta.

3- Plantas ornamentales: el geranio

El geranio es una planta ornamental originaria de Sudáfrica, introducida en Europa en el año de 1710. Se cultiva como planta de temporada, o como planta vivaz en regiones de clima suave como es el mediterráneo. Sus colores claros y brillantes y su abundante floración hacen que sea una de las plantas más solicitadas en el mercado de plantas ornamentales, habiéndose consolidado como una de las de mayor importancia económica en Europa. Es una especie tetraploide ($4x2n=36$) y se clasifica taxonómicamente dentro de la familia Geraniaceae, género *Pelargonium*, el único de los 11 géneros de esta familia con importancia ornamental. Fundamentalmente existen tres variedades de geranios cultivados con finalidades comerciales, todas resultado de cruces entre diferentes especies del género. La más importante es el geranio zonal (*Pelargonium zonale*), con hojas y tallos tomentosos, seguida de *P. peltatum*, con un porte colgante y hojas más carnosas. Por último, está la variedad *Pelargonium grandiflorum* o *Pelargonium hortorum*, con grandes y bellas flores que sólo se producen en primavera y verano.

El cultivo de *Pelargonium* representa una de las principales producciones de plantas ornamentales en Europa, con un comercio anual de cerca de 600 millones de plantas (Infoagro, 2005). La industria del cultivo de plantas ornamentales mantiene una tasa de crecimiento entorno al 12% que se puede aplicar tanto a Europa como al mercado americano. El sector de flores y plantas vivas en España contribuye de manera importante a la balanza comercial, con las exportaciones situándose en los 219 millones de euros en 2002, y 139 millones de euros solamente en el primer semestre de 2003 (datos de la FEPEX, Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortaliza, Flores y Plantas vivas).

La variedad *P. zonale* se multiplica principalmente por propagación vegetativa a partir de esquejes (variedades de flor doble), aunque también puede hacerse a partir de semillas de híbridos (variedades de flor simple). La multiplicación por esquejes es más rápida, pero presenta mayores riesgos de infección por patógenos, ya que si la planta madre está infectada, esta contaminación se extenderá a toda la descendencia. El mercado de la propagación por esquejes en Europa genera cerca de 80 millones de esquejes/año, suponiendo un mercado potencial de 240 millones de euros (Alonso y Borja, 2005).

Hasta el momento, la mejora de las plantas ornamentales mediante técnicas de cruzamientos clásicos, se ha dirigido a la obtención de nuevas variantes fenotípicas, atendiendo principalmente a aspectos de forma y color de las flores y hojas, y del porte de la planta. La obtención de variedades resistentes mediante cruzamientos es muy limitada debido a la escasa disponibilidad de genotipos resistentes. El control de plagas y enfermedades se realiza mediante la utilización de productos químicos. Las enfermedades

Introducción

causadas por hongos son responsables de gran parte de las pérdidas en la producción de geranios, y son las que representan más gastos en productos fitosanitarios en los cultivos de invernadero. Sin considerar el impacto ecológico de la utilización de fungicidas, el coste económico en la producción de plantas ornamentales es de 10.000 euros al año por hectárea de invernadero (Alonso y Borja, 2005). Entre los hongos que infectan el geranio, se destaca *Botrytis cinerea*, que presenta una amplia distribución mundial y es muy frecuente en los cultivos de invernadero.

Por otra parte, se dispone ya de métodos adecuados para el cultivo *in vitro* de plantas ornamentales concretas, lo que puede acelerar el desarrollo de nuevas variedades genéticamente modificadas (Tanaka et al, 2005). Algunas plantas ornamentales, como orquídea, clavel, petunia, tulipán, crisantemo, rosa y geranio han sido ya modificadas genéticamente, siendo la alteración en el color de las flores la principal característica manipulada (Courtney-Gutterson et al, 1994; Davies et al, 1998; Tanaka et al, 1998; Aida et al, 2000; Mol et al, 1999; Mercuri et al, 2001; Farzad et al, 2002). También se han descrito modificaciones en vías biosintéticas, como en la de la hormona etileno, con la finalidad de modular sus niveles y obtener plantas que permanezcan más tiempo verdes y con flores vistosas (Chang et al, 2003). Por último, también se han descrito alteraciones del olor de las flores (Vainstein et al, 2001; Verdonk et al, 2003). Además de la importancia de manipular características morfológicas, una aplicación evidente de la biotecnología es el aumento de la resistencia frente a plagas y patógenos en estas plantas. En este sentido, se han obtenido ya algunas plantas ornamentales resistentes a virus (Berthomé et al, 2000), artrópodos (Griesbach et al, 2002), bacterias (Kuehnle et al, 2004) y hongos (Marchant et al, 1998; Bi et al, 1999; Li et al, 2003). La utilización de la biotecnología vegetal en este sector, tanto para aumentar su valor ornamental como para reducir los costes de producción y los impactos medioambientales mediante la obtención de variedades resistentes a plagas y patógenos, representa un gran avance para el mercado de las plantas ornamentales.

3.1- La podredumbre gris del geranio

Esta enfermedad es causada por el hongo *Botrytis cinerea* (estado anamorfo), que se clasifica en la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, orden Hyphales, clase Hyphomycetes (Agrios, 1988). El estado telomorfo de *B. cinerea*, *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, es raramente observado en la naturaleza (Daughtrey, 1995).

Botrytis cinerea es uno de los patógenos vegetales más destructivos, siendo capaz de infectar tanto tejidos vegetativos como flores y frutos. Infecta a más de 200 especies de plantas, principalmente dicotiledóneas. Se desarrolla de manera óptima en condiciones de alta humedad y a temperaturas entre 24 y 28°C, aunque tiene una gran capacidad de

adaptación, pudiendo vivir a temperaturas que van de 0° a 35°C. La infección causada por este hongo se caracteriza por manchas marrones grisáceas en las partes aéreas de la planta, principalmente hojas y flores, aunque también infecta el tallo, generalmente aprovechándose de los cortes producidos en la propagación vegetativa (fig. 7). En condiciones ideales para el crecimiento del hongo, las lesiones se pueden ver a las 24h de infección.



Figura 7: Síntomas de infección por *Botrytis cinerea* en hojas y tallo de geranio.

La infección se inicia con el desarrollo de hifas provenientes de un tejido infectado que entra en contacto con una planta sana. También puede iniciarse a partir de conidios transportados por corrientes de aire o gotas de agua. Los conidios se forman en las células esporogénicas del conidioforo (que recuerda un racimo de uva), y tienen una forma ovoidal o elíptica, midiendo aproximadamente 8-14 x 6-9 μm (fig. 8). El gran poder de infección de *Botrytis cinerea* se debe al hecho de que puede sobrevivir como saprófito, a su capacidad de invadir rápidamente los tejidos vegetales y producir gran cantidad de conidios fácilmente dispersados por el aire (Agrios, 1988).

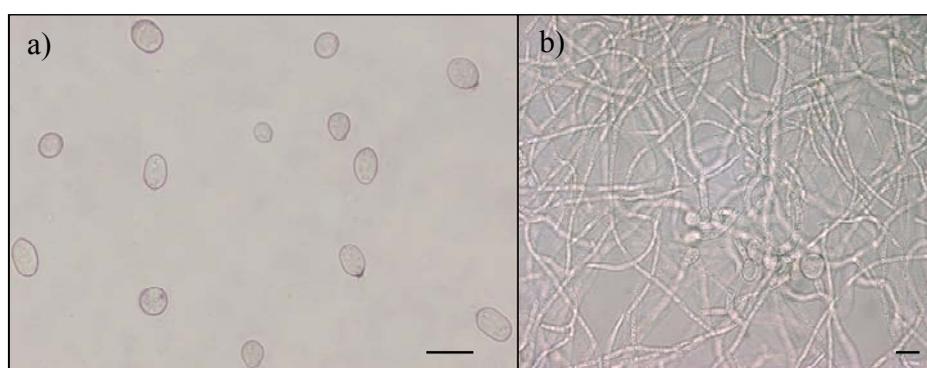


Figura 8: a) Conidios de *B. cinerea*. b) Hifas de *B. cinerea* crecidas en medio líquido.
Barras = 5 μm .

Introducción

Actualmente, el control de esta enfermedad se hace con la utilización de fungicidas como el benzimidazol y la dicarboximida, que requieren repetidas aplicaciones para ser efectivos, sobretodo antes de que aparezcan los síntomas (Hausbeck y Moorman, 1996). Además del problema ecológico, la utilización de tales productos conlleva a la aparición en el hongo de resistencias a los fungicidas, tal y como ya se ha descrito en poblaciones naturales de este patógeno (Leroux *et al*, 1999). El intercambio de variedades de geranio entre diferentes invernaderos facilita la propagación de estas cepas resistentes, dificultando aún más su control. Una alternativa al uso de fungicidas es el control biológico con la utilización de hongos antagonistas, como *Trichoderma harzianum* Rifai, aunque esta técnica ha demostrado ser menos eficiente que la utilización de compuestos químicos. Además es difícil sincronizar las poblaciones y se necesita un ambiente perfectamente adecuado dentro de los invernaderos. La susceptibilidad a *B. cinerea* varía mucho entre los diferentes cultivares de geranio, y hasta el momento no se ha identificado ningún gen de resistencia frente a este hongo, aunque se sabe que las variedades diploides son más resistentes que los genotipos tetraploides. De esta manera, la introducción de genes antifúngicos en plantas de geranio puede representar una buena alternativa para la obtención de plantas resistentes a *B. cinerea*.

4- Mecanismos de defensa en plantas

Las plantas, como otros seres vivos, están constantemente expuestas a una gran variedad de situaciones ambientales, en muchas ocasiones adversas, y a agresiones causadas por organismos de su entorno, a las cuales deben responder y adaptarse para sobrevivir. Una misma planta puede ser afectada por cientos de diferentes organismos potencialmente perjudiciales, desde agentes infecciosos (virus, viroides, bacterias, hongos) hasta organismos consumidores de vegetales (insectos, nemátodos). Cualquiera de estos organismos es capaz de interferir de una u otra manera en los procesos naturales del desarrollo, crecimiento o reproducción de una planta. En la naturaleza, sin embargo, la situación más frecuente es aquella en la que una planta no es huésped natural de un organismo potencialmente patogénico, con lo cual no se produce ningún efecto perjudicial.

Cuando se produce el ataque por un patógeno se activan rápidamente una serie de respuestas de defensa, tanto a nivel local como sistémico (por toda la planta, incluso en partes que no han sido infectadas) (Hammond-Kosack y Parker, 2003; Veronese *et al*, 2003; Dmitriev, 2004). Las plantas presentan una primera línea de defensa (defensa pasiva) basada en la existencia de barreras físicas y/o bioquímicas (Agrios, 1988; García-Olmedo *et al*, 1998; Heath, 2000; Castro y Fontes, 2005). Las barreras físicas tienen como objetivo impedir la entrada del patógeno en el interior de la planta, y están formadas por las ceras y

la cutícula de la superficie de las hojas; por la estructura de las paredes celulares (principalmente de la pared exterior de las células de la epidermis); y por el tamaño y forma de los estomas. Las barreras bioquímicas consisten en la acumulación de compuestos en los tejidos vegetales que pueden resultar tóxicos para microorganismos o fitófagos. Así, en muchos órganos (frutos, hojas, tubérculos) se acumulan compuestos fenólicos, taninos y enzimas hidrolíticas en elevadas concentraciones que poseen propiedades antifúngicas frente a fitopatógenos. No está claro, sin embargo, que una planta sea resistente a un patógeno concreto por el mero hecho de acumular este tipo de compuestos.

Por otro lado, además de las defensas constitutivas, la mayoría de las plantas también responden al ataque de un patógeno activando una serie de respuestas que se conocen como defensa general o resistencia inducida (Heath, 2000; San Segundo y Coca, 2004; Castro y Fontes, 2005). Estas respuestas están asociadas a cambios importantes en la expresión génica y son inducidas por la presencia del patógeno. La respuesta de defensa inducida también va acompañada de cambios estructurales y bioquímicos. Entre las alteraciones estructurales más importantes se observa un reforzamiento de la pared celular, lignificación y deposición de callosa, así como acumulación de proteínas estructurales de pared (proteínas ricas en hidroxiprolina, glicina y prolina) y deposición de resina en los espacios intercelulares. Todas estas alteraciones ocurren en la proximidad del punto de infección con el objetivo de aislar el patógeno y de impedir el flujo de nutrientes y agua provenientes de las células vecinas.

Las alteraciones bioquímicas se basan en la síntesis de compuestos antimicrobianos de naturaleza muy diversa que poseen un efecto nocivo directo sobre el patógeno. En el proceso que va desde el reconocimiento del patógeno hasta la producción de estos compuestos con actividad antimicrobiana se pueden diferenciar las siguientes etapas:

1) Reconocimiento entre la planta y el patógeno. Para que un patógeno sea capaz de infectar una planta, éste tiene que reconocerla como huésped. Esto ocurre a través de moléculas o estructuras específicas que existen en la superficie de la planta (factores de reconocimiento). Si no se produce este reconocimiento, el patógeno no es capaz de adherirse a su superficie y no produce las sustancias (enzimas hidrolíticas, toxinas) o estructuras (apresorio, gancho de penetración, haustorio) necesarias para que ocurra la infección (Castro y Fontes, 2005). Por otro lado, para que haya una respuesta de defensa efectiva por parte de la planta, ésta también debe detectar y reconocer el patógeno de manera rápida para que se pueda desencadenar una respuesta adecuada en el menor tiempo posible. En la mayoría de los casos, la respuesta que se desencadena por parte de la planta es de tipo general e inespecífica. De hecho, en la naturaleza la mayor parte de las veces las interacciones planta-microorganismo que se producen no son específicas. Este tipo de interacción desencadena una respuesta conocida como *nonhost resistance* o resistencia

Introducción

general inducida. En este caso, el reconocimiento del patógeno por la planta se hace a través de moléculas conocidas como elicitores generales. El reconocimiento de estos elicitores generales o *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) provenientes del patógeno es la base de las respuestas de la "inmunidad innata" tanto de plantas como de animales, y permite reconocer y diferenciar sus propios componentes celulares de los de otros organismos (Jones y Takemoto, 2004; Myrose y Ryu, 2004; Nürnberger y Lipka, 2005). Estos PAMPs son reconocidos por receptores en la membrana plasmática llevando a la activación de vías de transducción de señal que culminan en la activación de la expresión de genes implicados en la defensa. Estas moléculas son de estructura y naturaleza diversa, y están muy conservadas (Navarro *et al*, 2004). Algunos ejemplos son los componentes de las paredes celulares de bacterias y hongos, como flagelina, lipopolisacáridos, peptidoglucanos, glicoproteínas y carbohidratos (Heath, 2000; Veronese *et al*, 2003; Nürnberger *et al*, 2004). Estos elicitores generales actúan activando las respuestas de defensa de la planta, pero no necesariamente llevando a la resistencia. Esta característica, juntamente con la amplia distribución de las PAMPs entre los fitopatógenos, distingue claramente estas moléculas de los productos de los genes de avirulencia *avr* de los patógenos, que confieren resistencia mediante un reconocimiento específico del producto del gen *avr* con el producto de un gen *R* de resistencia correspondiente de la planta (ver más adelante) (Dangl y Jones, 2001; Brunner *et al*, 2002). A pesar de la existencia de una gran variedad de proteínas antimicrobianas vegetales, se pueden desarrollar enfermedades en las plantas. Esto ocurre bien porque el patógeno no es reconocido por la planta, o bien porque aunque sea reconocido y se desencadene una respuesta de defensa, el patógeno consigue neutralizar de alguna manera la acción de las proteínas antimicrobianas producidas por la planta. La planta a su vez, sólo es capaz de impedir una infección si el reconocimiento del patógeno y la acción antimicrobiana de sus proteínas de defensa son efectivos (Veronese *et al*, 2003).

2) Transmisión de la señal hasta el núcleo. Como resultado del reconocimiento del patógeno por la planta, se activan una serie de reacciones que llevan a la activación transcripcional de los genes de defensa. Lo primero que se observa son alteraciones en los niveles intracelulares de iones, con la entrada de Ca^{2+} y H^+ , y la salida de K^+ y Cl^- , un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO), y la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que tienen la doble función de atacar directamente el patógeno y de actuar como moléculas señalizadoras en la respuesta defensiva (Chen *et al*, 1993). Se observan asimismo procesos de fosforilación/defosforilación de proteínas que tienen como objetivo final activar la transcripción de los genes de defensa cuyos productos actuarán directamente sobre el patógeno.

3) Acumulación de compuestos antimicrobianos. Como consecuencia de la activación de la respuesta de defensa, se acumulan en la célula vegetal diversos compuestos con actividad antimicrobiana. Entre ellos podemos destacar las fitoalexinas, compuestos fenólicos que se producen en las células adyacentes a la célula infectada y dañada, como respuesta a señales que difunden de éstas. La mayoría de las fitoalexinas son tóxicas e inhiben el crecimiento de hongos, aunque hay algunas tóxicas también a bacterias, nemátodos y virus. Otro importante grupo de proteínas que se sintetizan en la respuesta de defensa son las clasificadas de forma genérica como proteínas asociadas a la patogénesis, o proteínas PR (de Pathogenesis Related Proteins) (ver más adelante).

En determinados casos, la interacción planta-patógeno está condicionada genéticamente y se basa en la teoría gen-a-gen propuesta por Flor (Flor, 1956, 1971). Ésta desencadena una respuesta conocida como *host resistance*. Estas resistencias presentan una gran especificidad en lo que se refiere a los genotipos de ambas partes (variedad de la planta huésped y raza del patógeno). En este caso la resistencia está determinada por la interacción entre los productos de los **genes de resistencia** vegetales (**R**) y los de **avirulencia** del patógeno (**avr**). Este modelo propone que para cada gen *R* que confiere resistencia a una planta existe un complementario gen *avr* que confiere la virulencia del patógeno, de manera que cada gen *R* solamente puede reconocer su complementario gen *avr*. Para que se establezca una respuesta de defensa capaz de conferir resistencia, ambos genes han de tener carácter dominante (**interacción incompatible**). En el caso de que uno de los dos, o ambos genes sean recesivos, el patógeno no es reconocido por la planta y es capaz de causar la infección (**interacción compatible**). Cuando el patógeno es reconocido por la planta y no causa la enfermedad, se denomina avirulento, mientras que cuando no es reconocido y es capaz de infectar la planta huésped se denomina virulento (Agrios, 1988).

Las interacciones incompatibles (resistencia) se manifiestan frecuentemente con una respuesta de la planta conocida como **reacción hipersensible (HR)**. La HR se caracteriza por la disminución del turgor debido a la rápida pérdida de integridad de la membrana plasmática, por un aumento en la respiración y en las especies reactivas de oxígeno, por la acumulación de compuestos fenólicos y por la producción de fitoalexinas. El resultado es el colapso y muerte de las células infectadas y de las adyacentes, lo cual contribuye a aislar el patógeno y frenar así su avance por la planta (Agrios, 1988; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Baker *et al*, 1997; Glazebrook *et al*, 1997; Agrawal *et al*, 1999). Por todas las similitudes que presentan, se ha sugerido que la HR es un tipo de muerte celular programada, e incluso se compara a la apoptosis que ocurre en los animales (Mittler *et al*, 1995; Alvarez *et al*, 1998; Heath, 1998; Xie y Chen, 2000).

La utilización de genes de resistencia *R* es contemplada como una estrategia a utilizar en programas de mejora y protección frente a enfermedades. Sin embargo, en el caso de la

Introducción

piriculariosis esta estrategia ha demostrado no ser efectiva debido a la gran variabilidad en la patogenicidad de los aislados de *M. grisea* (Valent y Chumley, 1994). La resistencia que presentan muchos cultivares es por lo tanto poco duradera en campo. Una posible solución sería la introducción de varios genes *R* simultáneamente en un determinado cultivar. Sin embargo, y a pesar de que la interacción arroz/*M. grisea* representa un sistema modelo en el campo de las interacciones planta/patógeno, únicamente se han identificado y caracterizado dos genes de resistencia para la piriculariosis, el gen *Pib* (Wang Z-X *et al*, 1999) y *Pita* (Bryan *et al*, 2000). Por otra parte, se han clonado 4 genes *avr*, *PWL1*, *Avr-Pita*, *Avr1-CO39*, and *ACE1* (Kang *et al*, 1995; Jia *et al*, 2000; Chauhan *et al*, 2002; Böhnert *et al*, 2004). En el caso de geranio, no se han descrito cultivares resistentes a *B. cinerea*.

4.1- Las proteínas PR (*Pathogenesis Related Proteins*)

Las proteínas PR son proteínas que se sintetizan y acumulan en tejidos de la planta en situaciones de patogénesis (infección por diferentes tipos de patógenos como virus, viroides, bacterias y hongos) o en situaciones relacionadas, como herida (asociadas al ataque por depredadores) o tratamiento con agentes químicos (Agrawal *et al*, 1999; van Loon, 1999; Dangl y Jones, 2001; Nimchuk *et al*, 2003). Se identificaron por primera vez como proteínas sintetizadas *de novo* en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (interacción incompatible) (van Loon y van Kammen, 1970). Desde entonces, se ha podido comprobar que además de los virus, la infección por hongos y bacterias o el ataque por insectos también inducen la acumulación de proteínas PR (van Loon, 1999). Las proteínas PR se acumulan localmente, esto es, en el sitio de infección, y también sistémicamente, en partes de la planta distantes del punto de infección. Además de su inducibilidad en situaciones relacionadas con la defensa, algunos genes *PR* presentan una expresión ligada al desarrollo de la planta. Así, se pueden encontrar en órganos asociados a la reproducción como flores y semillas, y también en tubérculos (van Loon, 1999). En tabaco, se ha visto que algunas proteínas PR que se expresan de una manera regulada por el desarrollo pueden ser inducidas en respuesta a infecciones, tanto en el mismo órgano, como en órganos diferentes (van Loon, 1999). La mayoría de las proteínas PR que presentan este patrón de expresión, son proteínas básicas, y susceptibles de regulación tanto por condiciones de estrés como por hormonas. Una posible función de estas proteínas sería la rápida generación de señales internas específicas, que pueden actuar como señales morfogénicas en el desarrollo de la planta, a la vez que contribuyen a generar señales para la puesta en marcha de las respuestas de defensa, por ejemplo a través de la degradación de componentes de la pared celular de los patógenos. De esta manera, un nivel basal existente de estas proteínas también podría tener la función de acelerar y amplificar los

procesos de defensa. También se ha visto que en muchos tejidos florales se encuentran proteínas PR que se acumulan de manera constitutiva, no dependiente de infección. Su presencia puede representar una buena estrategia de defensa de la planta, principalmente cuando se trata de órganos responsables de la reproducción y consolidación de la especie, como son las flores y las semillas (van Loon, 1999).

Se pueden distinguir dos tipos de proteínas PR: las ácidas, localizadas predominantemente en el espacio extracelular, y las básicas que se localizan principalmente en la vacuola (Dmitriev, 2004). Actualmente, las PRs se clasifican en 17 familias según sus secuencias nucleotídicas o proteicas, relaciones serológicas y función (tabla 2) (van Loon y van Strien, 1999; <http://www.bio.uu.nl/~fytopath>).

Tabla 2: Familias de proteínas PR. Tomado de van Loon, 2005.

Familia	Miembro tipo	Propiedad
PR-1	PR-1a de tabaco	Antifúngica ?
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3 glucanasa
PR-3	P, Q de tabaco	quitinasa de tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	"R" de tabaco	quitinasa de tipo I, II
PR-5	S de tabaco	tipo taumatina
PR-6	inhibidor I de tomate	inhibidor de proteasas
PR-7	P ₆₉ de tomate	endoproteinasa
PR-8	quitinasa de pepino	quitinasa de tipo III
PR-9	"peroxidasa productora de lignina" de tabaco	peroxidasa
PR-10	PR-1 de perejil	tipo ribonucleasa
PR-11	quitinasa de clase V de tabaco	quitinasa de tipo I
PR-12	Rs-AFP3 de rábano	defensina
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	tionina
PR-14	LTP4 de cebada	proteína transferidora de lípidos
PR-15	OxOa (germin) de cebada	oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP de cebada	tipo oxalato oxidasa
PR-17	PRp27 de tabaco	desconocida

Las proteínas de la familia **PR-1** fueron las primeras en ser identificadas en la interacción tabaco/virus TMV, y son las que se acumulan en mayor cantidad en el tejido infectado (Buchel y Linthorst, 1999). A pesar de ser muy abundantes, no se conoce con exactitud su función, aunque se ha descrito que algunos miembros presentan actividad

Introducción

antifúngica. En esta familia se encuentran tanto proteínas ácidas como básicas. Son proteínas de un peso molecular de aproximadamente 14-17 kDa

En la familia **PR-2** se encuentran las proteínas con actividad β -1,3 glucanasa. Las glucanasas de clase I son proteínas básicas y vacuolares, mientras que las de clase II y III son ácidas y extracelulares. El modo de acción relacionado con la defensa se basa en su capacidad de hidrolizar los β -1,3 glucanos presentes en la pared celular de los hongos. Como resultado de su actividad hidrolítica se pueden liberar fragmentos de pared del hongo que son reconocidos por la planta y funcionan como elicitores de la respuesta general inducida. Además de participar en la defensa vegetal, las β -1,3 glucanasas participan también en procesos de desarrollo normal de las plantas, como la germinación del polen, fertilización, embriogénesis, maduración del fruto, germinación de las semillas, y en la movilización de las reservas del endospermo en cereales (Leubner-Metzer y Meins, 1999).

Las quitinasas son proteínas PR que pertenecen a las familias **PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11**. Son proteínas ácidas o básicas, con pesos moleculares entre 26 y 43 kDa, que se agrupan en 5 clases con base en sus características estructurales y funcionales. La familia PR-8 incluye las quitinasas que tienen también actividad lisozima. Al igual que las β -1,3 glucanasas, las quitinasas también pueden encontrarse en tejidos vegetales de manera independiente de la infección. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en bacterias, hongos, animales y plantas (Neuhaus, 1999; Kasprzewska, 2003). Su mecanismo de acción se basa en la hidrólisis de los enlaces β -1,4 entre los residuos de N-acetilglucosamina de la quitina, principal componente de la pared celular de muchos hongos y del exoesqueleto de invertebrados. Se cree que las quitinasas y las β -1,3 glucanasas actúan de manera conjunta frente al ataque de patógenos. Se piensa que las formas ácidas que son secretadas al espacio extracelular son responsables de la liberación de elicitores de la pared del hongo induciendo de esta manera las respuestas de defensa de la planta. Las formas básicas acumuladas en la vacuola representan la segunda línea de defensa, de manera que una vez el patógeno hubiera conseguido penetrar en la célula vegetal se produciría su liberación localmente a concentraciones importantes (Neuhaus, 1999; Kasprzewska, 2003).

La familia **PR-5** se compone de proteínas denominadas *thaumatin like* debido a la gran similitud de secuencia que presentan con la proteína taumatina del arbusto *Thaumatococcus daniellii*. Al igual que las proteínas PR-1, se identificaron por primera vez en la interacción tabaco/TMV. Se trata de un grupo de proteínas con un tamaño de aproximadamente 25 kDa, puntos isoeléctricos muy variados, y una estructura muy compacta con 8 puentes disulfuro que les proporciona gran estabilidad y resistencia a la degradación por calor o proteasas. La expresión de las proteínas de esta familia se induce

por infección viral y fúngica, así como en respuesta a estrés osmótico y herida (Velazhahan *et al*, 1999).

Los inhibidores de proteasas componen la familia **PR-6**. Estas proteínas se acumulan de forma natural en órganos de reserva como semillas y tubérculos, y también se inducen en respuesta a herida, ya sea herida mecánica o por el ataque de insectos fitófagos. Actúan inhibiendo las actividades proteolíticas del sistema digestivo de larvas de insectos. Ello disminuye la calidad nutricional del tejido del que se alimenta la larva. En algunos casos el insecto deja de alimentarse de la planta. Si no es así, y la larva continua alimentándose, se produce un retardo importante en el crecimiento y desarrollo larvario, lo cual lleva en muchos casos a su muerte. Además de actuar frente a insectos, también se ha visto que pueden inhibir el crecimiento de hongos, aunque todavía no se conoce el mecanismo por el cual ejercen esta actividad antifúngica (Heitz *et al*, 1999). También se les atribuye una función defensiva frente a nemátodos.

La endoproteinasa P69 de tomate es la representante de la familia **PR-7**, y su expresión se induce en plantas infectadas con viroides (Vera y Conejero, 1988). La familia **PR-9** incluye las peroxidasas, que pueden ser básicas y vacuolares, o ácidas y extracelulares. Su función en la defensa está directamente relacionada con el reforzamiento de la pared celular catalizando la deposición de lignina en respuesta tanto a patógenos como a insectos (Chittoor *et al*, 1999). Las proteínas de la familia **PR-10** tienen como principal característica una localización citosólica y una actividad ribonucleasa (Datta y Muthukrishnan, 1999).

Las familias **PR-12**, **PR-13** y **PR-14** incluyen respectivamente las defensinas, tioninas y proteínas transportadoras de lípidos. Son proteínas con actividad antimicrobiana y se caracterizan por su bajo peso molecular, su naturaleza básica y el hecho de ser ricas en residuos de cisteína (van Loon y van Strien, 1999; Datta y Muthukrishnan, 1999).

La familia **PR-12**, las defensinas, son un grupo de péptidos básicos de aproximadamente 4 kDa, ricos en cisteínas, estructurados con diferentes motivos, y que están estrechamente relacionados con la defensa de las plantas frente a patógenos (Lay y Anderson, 2005). Además de en plantas, se han identificado defensinas en muchos otros organismos, como son moluscos, ácaros, artrópodos, insectos y mamíferos. Es el único grupo de proteínas del sistema de inmunidad innato que se encuentra conservado entre plantas, vertebrados e invertebrados (Thomma *et al*, 2002), lo que sugiere que son un grupo antiguo de proteínas que se originó antes de la divergencia entre plantas y animales (Thevissen *et al*, 2004). En los mamíferos, estas proteínas tienen una estructura de hoja- β antiparalela estabilizada por 3 puentes disulfuro. Las defensinas de invertebrados y de plantas se caracterizan por tener 3 y 4 puentes disulfuro respectivamente, y una estructura conservada formada por una α -hélice ligada a una hoja- β por 2 puentes disulfuro (Marshall y

Introducción

Arenas, 2003; Thevissen *et al*, 2004). Aunque haya una gran conservación a nivel de estructura secundaria, sus secuencias de aminoácidos son bastante divergentes, conservándose solamente los residuos de cisteína que estabilizan la estructura. Esta variación puede reflejar las diferencias en las actividades biológicas de cada defensina, así como la adaptación de las diferentes especies que las producen, a sus entornos naturales (Zasloff, 2002; Spelbrink *et al*, 2004).

En plantas, la expresión de los genes de defensinas, al igual que los otros genes PR, se induce en respuesta al ataque por patógenos. Probablemente son el grupo de proteínas antimicrobianas más estudiado (Conceição y Broekaert, 1999; Thomma *et al*, 2002; Castro y Fontes, 2005). Se aislaron por primera vez en los años 90, y en un principio se clasificaron como una tercera clase de tioninas, las γ -tioninas, por la similitud de secuencia aminoacídica (Collila *et al*, 1990). Más tarde se observó que las γ -tioninas presentaban bajos niveles de similitud estructural con otras tioninas ya descritas. En 1995, se aceptó que estas proteínas se considerasen como un grupo no relacionado evolutivamente con las tioninas y se renombraron defensinas (Broekaert *et al*, 1995). Las defensinas de plantas poseen actividad antifúngica, encontrándose defensinas morfogénicas, esto es, que inducen cambios en las hifas de los hongos susceptibles (ramificación y aumento del grosor, principalmente en las puntas), y defensinas no-morfogénicas, las cuales inhiben el crecimiento de las hifas pero sin causar cambio en la morfología de las mismas (Broekaert *et al*, 1995; Thomma *et al*, 2002). No se ha demostrado que tengan un efecto tóxico frente a células de plantas ni de mamíferos (Thomma *et al*, 2002; Ferket *et al*, 2003).

Las defensinas de mamíferos e insectos ejercen su actividad antifúngica por la formación de canales iónicos y poros en la membrana plasmática. En el caso de las defensinas vegetales existen evidencias de que la permeabilización de la membrana viene determinada por interacciones específicas y de elevada afinidad con sitios de unión en la membrana del hongo (Thevissen *et al*, 1997; Theis y Stahl, 2004; Spelbrink *et al*, 2004). Se ha visto que una defensina de dalia (DmAMP1) y otra de rábano (RsAFP2) inducen varias alteraciones fisiológicas, como una rápida entrada de Ca^{2+} y salida de K^+ , y alcalinización del medio. Estas alteraciones requieren la presencia de receptores específicos en la membrana fosfolipídica, en el caso de *Neurospora crassa* (Thevissen *et al*, 1996). Más concretamente, se ha demostrado, que el modo de acción de la proteína DmAMP1 es dependiente de la presencia de esfingolípidos, uno de los principales componentes de las membranas de eucariotas (Thevissen *et al*, 2000). Así, en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en un gen involucrado en la biosíntesis de esfingolípidos, la defensina de dalia DmAMP1 no presenta actividad (Thevissen *et al*, 2000; Thomma *et al*, 2002; Ferket *et al*, 2003).

La actividad antifúngica y el amplio espectro de acción de las defensinas hacen que estas proteínas tengan un gran potencial para ser utilizadas en la obtención de plantas

transgénicas resistentes a patógenos. Así, se ha descrito que la expresión constitutiva de una defensina de rábano en tabaco y tomate permite aumentar la resistencia frente a varios patógenos (Terras *et al*, 1995; Parashina *et al*, 2000). Otros ejemplos, como son la expresión de una defensina de guisante en canola (Wang *et al*, 1999), o de una defensina de alfalfa expresada en plantas de patata también han permitido obtener resistencia frente a patógenos (Gao *et al*, 2000).

La familia **PR-13** la forman las tioninas. Estas fueron las primeras proteínas de plantas para las cuales se demostró una actividad antifúngica *in vitro* (Bohlmann, 1999). Son proteínas antimicrobianas muy ricas en cisteínas (contienen 6 u 8 residuos de cisteína conservados), generalmente muy básicas ($pI > 8$), y con un peso molecular de aproximadamente 5 kDa (Thevissen *et al*, 1996; Marshall y Arenas, 2003). Su secuencia aminoacídica es muy conservada, y la estructura tridimensional tiene forma de "L", donde el brazo vertical está formado por un par de hélices- α antiparalelas con residuos hidrofóbicos e hidrofílicos distribuidos a un lado o a otro de cada hélice. El brazo horizontal consiste en una pequeña hoja β antiparalela, que confiere carácter anfipático de la molécula (Teeter *et al*, 1990). Las tioninas muestran toxicidad *in vitro* frente a bacterias y hongos fitopatógenos (Bohlmann, 1999). La expresión de los genes que codifican las tioninas se induce en respuesta al ataque por patógenos. Ello unido a su toxicidad frente a patógenos apoya una función importante de estas proteínas en la respuesta de defensa de las plantas. Presentan efectos tóxicos frente a bacterias, hongos, levaduras, células animales y algunas vegetales (Castro y Fontes, 2005). El mecanismo inicialmente descrito para explicar su actividad antifúngica es a nivel de la membrana plasmática (Thevissen *et al*, 1996; Broekaert *et al*, 1997). Su toxicidad requiere interacciones electrostáticas con los fosfolípidos negativos de la membrana, posible por su carácter anfipático, seguida de la formación de poros o de la interacción con determinados dominios presentes en la bicapa lipídica (Thevissen *et al*, 1996). Además de su claro efecto en la membrana plasmática, también se ha descrito que las tioninas son capaces de inhibir la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro*, probablemente por una interacción directa con el RNAm o a nivel del inicio de la traducción (García-Olmedo *et al*, 1983; Brümmer *et al*, 1994). Las similitudes estructurales entre los motivos *helix-turn-helix* (H-T-H) de las tioninas y de las proteínas de unión a DNA llevó a proponer que las tioninas pueden representar un nuevo grupo de proteínas de unión a DNA (Marshall y Arenas, 2003). Las purotioninas, unas de las primeras tioninas descritas, son capaces de inhibir la enzima ribonucleótido reductasa, interfiriendo en la síntesis de DNA (Johnson *et al*, 1987). Otra de las posibles funciones *in vivo* descrita para las tioninas está asociada a su actividad como tioredoxinas, pudiendo ser por lo tanto mensajeros secundarios de tior en la regulación redox de enzimas (Johnson *et al*, 1987). Además, como muchas de estas proteínas se encuentran en las semillas, se les ha atribuido una función de

Introducción

proteínas de almacenamiento, principalmente como fuente de sulfuros (Castro y Fontes, 2005).

Los genes de las tioninas ya se han utilizado para la obtención de plantas transgénicas resistentes a hongos y bacterias patógenas por ejemplo, plantas de tabaco que expresan constitutivamente el gen α -*hordothionin* son resistentes a *Pseudomonas syringae* (Carmona *et al*, 1993). La expresión de una tionina de avena en arroz confiere resistencia a las bacterias *Burkholderia plantarii* y *B. glumae* (Iwai *et al*, 2002). También se han obtenido plantas de *Arabidopsis thaliana* resistentes a *Plasmodiophora brassicae*, expresando una tionina de muérdago (Holtorf *et al*, 1998), o a *Fusarium oxysporum* por sobreexpresión de una tionina endógena (Epple *et al*, 1997).

Las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) representan la familia **PR-14** de proteínas PR. Son proteínas involucradas en el transporte de lípidos desde su sitio de síntesis, el retículo endoplasmático, a otros orgánulos, como por ejemplo cloroplastos, mitocondrias o membrana plasmática (Kader, 1996; Guerbette *et al*, 1999). Se han descrito LTPs en mamíferos, hongos, bacterias y plantas (Selitrennikoff, 2001). Son proteínas pequeñas y básicas que se dividen en dos subfamilias según su peso molecular: 9 kDa (LTPs1) y 7 kDa (LTPs2). Aunque no tengan una secuencia primaria muy conservada entre ellas, la estructura tridimensional es muy parecida. Presentan una estructura muy compacta, formada por 4 segmentos de α -hélice (un 40% de la estructura total) conectados por 4 puentes disulfuro (Selitrennikoff, 2001; Ge *et al*, 2003a; Castro y Fontes, 2005). El dominio C-terminal es variable y se sintetizan con una extensión N-terminal, o péptido señal, para la entrada de la proteína en la ruta de secreción a través de su internalización en el retículo endoplasmático (Ge *et al*, 2003a). Poseen una cavidad hidrofóbica interna en forma de túnel que forma un sitio adecuado para la interacción entre la cadena alifática de los lípidos, con los residuos hidrofóbicos expuestos en la cavidad (Ge *et al*, 2003a; Castro y Fontes, 2005). Tienen baja especificidad, siendo capaces de transportar diferentes tipos de lípidos, por lo que se denominan también proteínas transportadoras de lípidos no específicas (ns-LTP).

Se han atribuido varias funciones a las LTPs. Se piensa que participan en la formación de la cutícula, en la embriogénesis, en el establecimiento de relaciones de simbiosis, y en la adaptación de las plantas a diferentes condiciones ambientales tales como cambios de temperatura, humedad, salinidad, o ataque por patógenos (Molina *et al*, 1993; Buhot *et al*, 2001; Selitrennikoff, 2001; Maldonado *et al*, 2002; Castro y Fontes, 2005). Su inducibilidad en situaciones de infección por patógenos llevó a incluir a las LTPs dentro de las proteínas PR. Se han caracterizado LTPs de maíz, cebada y pimienta, (Molina *et al*, 1993; Park C. J. *et al*, 2002; Ruelland *et al*, 2002; Jung *et al*, 2003), las cuales tienen capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias y hongos, como *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride*, *Cercospora beticola*

y *Magnaporthe grisea* (Terras *et al*, 1992; Molina *et al*, 1993; Kader, 1996; Carvalho *et al*, 2001; Ge *et al*, 2003b). Otro dato consistente con la participación de estas proteínas en la defensa vegetal es su localización en la pared celular (Castro y Fontes, 2005). En situaciones de infección por patógeno se observa una mayor acumulación de LTPs, tanto en las capas exteriores de la pared celular, como en el tejido vascular (Kader, 1996; van Loon y van Strien, 1999; Ge *et al*, 2003a). A pesar de la gran similitud estructural con las defensinas y tioninas, parece ser que el mecanismo de regulación de la expresión de las LTPs no responde a los mismos estímulos (van Loon y van Strien, 1999).

El mecanismo por el cual las LTPs ejercen su actividad antimicrobiana no se conoce. Recientemente, Regente y colaboradores (2005) han demostrado que una LTP de planta es capaz de permeabilizar la membrana de hongos formando poros que permiten la salida de iones de la célula llevando a la muerte celular. En ensayos de mutagénesis dirigida, se ha podido demostrar que la unión de estas proteínas a los lípidos no es decisiva para su actividad antifúngica, ya que mutantes que seguían manteniendo la capacidad de unirse a lípidos ya no eran efectivos frente a hongos (Ge *et al*, 2003b). Otro dato que corrobora estos resultados es el hecho de que una LTP de cebolla, la proteína Ace-AMP1, tiene una fuerte actividad antifúngica, pero no posee capacidad de unirse a lípidos (Cammue *et al*, 1995). En 2001, Buhot y colaboradores pudieron demostrar que una LTP de trigo se une a receptores localizados en la membrana plasmática de plantas de tabaco, una vez más indicando que hay otros factores además de la unión a lípidos que pueden estar involucrados en el mecanismo de acción de las proteínas LTP.

Se han obtenido plantas transgénicas resistentes a patógenos que expresan genes que codifican LTPs. Por ejemplo plantas de tabaco y *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan una LTP de cebada, muestran resistencia frente a la infección por bacterias (Molina y García-Olmedo, 1997). Estos estudios refuerzan el papel de estas proteínas en la defensa vegetal, y confirman su potencial biotecnológico para la obtención de plantas resistentes a patógenos.

Las familias **PR-15** y **PR-16** se componen de oxidasas de oxalato, también conocidas como germinas. Son proteínas oligoméricas muy resistentes a la desnaturalización por calor y SDS. En la interacción planta-patógeno estas proteínas son responsables de la producción de H₂O₂ a partir de oxalato, necesario para los procesos de polimerización mediados por peroxidasas (van Loon y van Strien, 1999; Datta y Muthukrishnan, 1999). Finalmente, la familia **PR-17** está compuesta por un nuevo tipo de proteínas de cerca de 25 kDa y que presentan homología con otras proteínas inducidas por patógenos en trigo y tabaco (Christensen *et al*, 2002). Ciertas regiones de estas proteínas presentan similitud con el centro activo de una exopeptidasa de eucariotas (aminopeptidasa N) y con una endopeptidasa de bacterias (termolisina). Su implicación y mecanismo de acción en la respuesta de defensa de las plantas aún no se conoce.

4.2- Respuestas de Defensa Sistémicas

Las plantas tienen la capacidad de desarrollar una respuesta de defensa tanto a nivel local como sistémico. Una vez se ha puesto en marcha todo el sistema de defensa local (2-3 días después del contacto inicial con el patógeno), ya sea como resultado de una resistencia inducida (o interacción inespecífica), o en situación de respuesta HR (interacción incompatible), se activa una respuesta sistémica por toda la planta. Esta respuesta, conocida como resistencia sistémica adquirida, SAR (Systemic Acquired Resistance), protege la planta de posteriores ataques, no sólo frente al patógeno causante de la respuesta inicial, sino también frente a otros patógenos (Ross, 1961). La SAR se caracteriza molecularmente por la acumulación de proteínas PR en diferentes tejidos de la planta. Además de observarse en respuesta al ataque por patógenos, también se puede inducir por tratamientos con agentes químicos concretos que actúan como inductores cuando son aplicados externamente (p. e. benzothiadiazole (BTH)).

Hasta la fecha, aún no se sabe cuál es la molécula responsable de la transmisión de la señal implicada en el establecimiento de la SAR (Agrios, 1988; Durrant y Dong, 2004). Durante mucho tiempo se pensó que era el **ácido salicílico (SA)**. Sin embargo, en experimentos utilizando mutantes deficientes en la acumulación de SA libre y mediante injertos cruzados con plantas salvajes, se observó que la SAR se seguía desarrollando. En el mismo experimento también se pudo comprobar que aunque el ácido salicílico no es la molécula responsable del establecimiento de SAR, se necesitan niveles elevados para que se observe resistencia en las hojas sistémicas (Vernooij *et al*, 1994). Por todo esto se puede concluir que el SA no es la molécula señalizadora responsable de la SAR, pero su acumulación es indispensable para que ocurra. El SA es mediador de varias de las respuestas de defensa, como la producción de las barreras de lignina, y de la expresión de genes PRs. El SA juega también un importante papel en la modulación del equilibrio redox y protege las plantas del estrés oxidativo (Yang *et al*, 2004). Es importante destacar que las plantas de arroz tienen un nivel basal de SA de 50 a 300 veces superior al que se encuentra en tabaco y *Arabidopsis*, incluso cuando comparamos los niveles en plantas infectadas (Chen Z. *et al*, 1997). En plantas de arroz infectadas por hongos o bacterias los niveles de SA varían muy poco, y cuando éste se aplica de manera exógena es un pobre activador de la expresión de genes PR y de la resistencia sistémica inducida. Estas observaciones sugieren que el SA endógeno puede no tener la función de molécula señalizadora en la resistencia inducida en arroz (Yang *et al*, 2004). Además de todo lo mencionado anteriormente, la SAR mediada por SA puede ser activada tanto por estreses bióticos como abióticos, poniendo de manifiesto la importancia de esta hormona vegetal en los procesos de respuesta de las plantas a los estímulos ambientales (Agrawal *et al*, 1999).

Más recientemente se ha propuesto que la molécula señalizadora implicada en la SAR sea una **molécula lipídica** ya que plantas mutantes en proteínas transportadoras de lípidos (Maldonado *et al*, 2002) o defectivas en la síntesis de lipasas (Falk *et al*, 1999; Jirage *et al*, 1999) no son capaces de establecer la SAR (aunque desarrollan normalmente las respuestas locales a la infección). Otra evidencia que corrobora un papel de moléculas lipídicas en la transmisión de la señal para la SAR es la identificación de una lipasa que se une a SA en tabaco, y cuya actividad aumenta hasta 5 veces en respuesta al tratamiento con esta hormona. Además, el silenciamiento del gen que codifica esta lipasa disminuye las respuestas de defensa locales y sistémicas (SAR) (Kumar y Klessig, 2003). Plantas de *Arabidopsis thaliana* con una mutación que inhibe la síntesis de ácidos grasos de la membrana de cloroplastos presentan una menor acumulación de ROS en hojas y una menor HR (Yaeno *et al*, 2004). Finalmente, una mutación en un gen involucrado en la síntesis de glicerolípidos reduce los niveles de acumulación de SA y de la proteína PR-1 en los tejidos sistémicos de la planta, comprometiendo la respuesta SAR (Nandi *et al*, 2004). Estos datos demuestran la participación de moléculas lipídicas en la respuesta de defensa.

Otra vía de señalización que lleva al establecimiento de la respuesta de defensa es la del **ácido jasmónico (JA)**, una hormona vegetal involucrada en diversos procesos del desarrollo de las plantas, incluyendo la senescencia, crecimiento y reproducción (Agrawal, 1999). El JA está relacionado con la defensa frente a algunos patógenos, y principalmente frente a insectos fitófagos (Schweizer *et al*, 1998). La primera evidencia fue la observación de un aumento local y sistémico de la concentración de JA en respuesta al ataque de insectos y patógenos (Staswick, 1992). Se ha observado que el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con metil-jasmonato aumenta la resistencia frente a ciertos hongos, pero no a bacterias.

El **etileno (ET)** es otra hormona vegetal, en estado gaseoso, que regula muchos de los procesos de desarrollo (germinación, maduración de frutos, senescencia) y respuestas a estrés en las plantas. Activa vías de señalización en respuesta al ataque por patógenos e insectos, e induce la acumulación de varios compuestos de defensa, como proteínas PR y lignina. Algunas plantas tratadas con ET se hacen más resistentes a hongos, virus e insectos. El ET, en combinación con el JA, es necesario para la inducción de la expresión de ciertos genes de defensa (quitinasas, defensinas e inhibidores de proteasas), genes que no son inducidos por la vía del SA (por ejemplo el gen de la defensina *PDF1.2*) (Penninckx *et al*, 1998). Las vías de señalización de SA, JA y ET están interconectadas sabiéndose que el tratamiento con SA o con JA resulta en la inducción de 55 genes en común (Schenk *et al*, 2000), existen también evidencias que llevan a creer en un antagonismo entre estas tres vías de señalización. La inducción de la SAR, fuertemente vinculada al SA, tiene un efecto negativo en las vías de JA/ET, normalmente inducidas en respuesta a insectos y herida.

Introducción

Asimismo un aumento en los niveles de SA se asocia a la inhibición de la síntesis de JA con la consecuente disminución de la expresión de genes activados por esta hormona (Heil y Bostock, 2002). Análisis en la expresión génica en plantas normales y plantas mutantes de *Arabidopsis* en la señalización de las vías del SA, JA y ET, revelan que aunque las vías del JA/ET pueden inhibir algunas veces la del SA es más frecuente que el SA inhiba la vía del JA (Glazebrook *et al*, 2003).

Se ha descrito otro tipo de respuesta de defensa sistémica que no depende de SA, y que no va asociado a la síntesis de proteínas PR, ni tampoco a la reacción hipersensible. Esta respuesta, definida como resistencia sistémica inducida (Induced Systemic Resistance, ISR) se identificó en la interacción de rizobacterias no patogénicas con algunas plantas, y también protege frente a nuevos ataques por virus, hongos y bacterias (van Loon *et al*, 1998). En relación a las vías de señalización involucradas en la respuesta de defensa ISR, parece estar modulada por ácido jasmónico y etileno (Piterse *et al*, 1998).

Uno de los componentes más estudiados involucrado en la vía del SA, es el gen ***npr1*** (non-expressor of PR genes, también denominado nim1 de non-inducible immunity phenotype) (Cao *et al*, 1994; Delaney *et al*, 1995). Este gen fue identificado en un mutante de *Arabidopsis* el cual mostraba una acumulación normal de SA después de una infección por patógeno, pero que era incapaz de expresar genes *PR* y de desarrollar una respuesta SAR (Cao *et al*, 1994; Delaney *et al*, 1995; Glazebrook *et al*, 1996). Por otro lado, la sobreexpresión de este gen en plantas de arroz y *Arabidopsis* lleva a un aumento en la resistencia frente a varios patógenos (Cao *et al*, 1998; Chern *et al*, 2001; Friedrich *et al*, 2001). Diferentes estudios han demostrado que este gen está implicado en la respuesta de defensa tanto a nivel local como en la respuesta SAR (Cao *et al*, 1994; Delaney *et al*, 1995; Glazebrook *et al*, 1996). La proteína NPR1 se localiza en el citoplasma de la célula en forma oligomérica estabilizada por puentes disulfuro. En situaciones de inducción, la proteína NPR1 (forma monomérica inducida por cambios redox citoplasmáticos) se transloca al núcleo (Kinkema *et al*, 2000) donde interacciona con factores de transcripción de la subclase bZIP (familia de factores TGA) que están involucrados en la activación dependiente de SA de genes PR (Després *et al*, 2000; Subramanian *et al*, 2001; Fan y Dong, 2002; Spoel *et al*, 2003). El gen *npr1* también es necesario para el establecimiento de la respuesta ISR en las interacciones con rizobacterias (Piterse *et al*, 1998; van Wees *et al*, 2000), y media las interconexiones entre las vías del SA, JA y ET. Las plantas mutantes en el gen *npr1* presentan una tolerancia reducida al SA, que además se acumula en cantidades más altas en estas plantas que en las normales (Cao *et al*, 1997; Kinkema *et al*, 2000). En experimentos con plantas de *Arabidopsis thaliana*, se ha visto que plantas mutantes incapaces de acumular SA producían 25 veces más JA que las salvajes y mostraban un aumento en la expresión de genes regulados por JA en respuesta a la infección por

Pseudomonas syringae pv. *tomato*. Además, en este mismo trabajo, se ha demostrado que el efecto antagonista del SA sobre el JA requiere la presencia de la proteína reguladora NPR1, pero en este caso no es necesaria la localización nuclear de NPR1. Esto indica que la interconexión entre estas dos vías está modulada por NPR1 en el citoplasma (Spoel *et al*, 2003). Podemos concluir que NPR1 es un importante regulador en las respuestas de defensa inducidas tanto por SA como por JA/ET, y que tiene la capacidad de regular diferencialmente estas respuestas según las diferentes señales.

La **sistemina**, un polipéptido de 18 aminoácidos, se produce en las hojas en respuesta al ataque de insectos o a un daño mecánico, siendo una molécula señal capaz de moverse por el floema. Es reconocida por receptores presentes en la superficie celular activando una cascada de señales mediada por lípidos que se origina con la liberación de ácido linoléico de la membrana plasmática y que conduce hasta la síntesis de ácido jasmónico (León *et al*, 2001).

El **ácido abscísico (ABA)** es otra de las hormonas vegetales involucrada en las respuestas de la planta, aunque más específicamente en aquellas relacionadas con estreses abióticos, como pueden ser la sequía o el exceso de salinidad. En lo que se refiere a la defensa, responde a la herida causada por insectos, probablemente en una vía de transducción de señal anterior a la del JA, aumentando los niveles de JA en tejidos dañados (Hildmann *et al*, 1992; Wasternack y Parthier, 1997).

La **sacarosa** es el producto primario de la fotosíntesis y se transloca a través de la planta por el floema desde las hojas fotosintéticamente activas hasta los otros órganos (semillas, flores u hojas en desarrollo). También es capaz de actuar como molécula señalizadora regulando la expresión génica. En 2003, Murillo y colaboradores pudieron correlacionar el aumento en los niveles de sacarosa en hojas de tabaco con la expresión de genes de defensa (PRs). Como resultado de ello, se observa la resistencia frente a patógenos. Estos datos indican que la sacarosa también podría ser una molécula señalizadora de las respuestas de defensa.

En definitiva, la respuesta de defensa de las plantas frente al ataque por patógenos o insectos está regulada por una amplia red de vías de transducción de señal. La interconexión entre ellas les proporciona un elaborado potencial de regulación que lleva a la activación de la defensa más adecuada frente a cada organismo invasor. Ocurren importantes reajustes fisiológicos en el que participan de manera decisiva las hormonas vegetales, que en esta situación adquieren nuevas funciones para proporcionar una defensa eficaz. Diferentes vías de transmisión de la señal de defensa actúan en cooperación y proporcionan una resistencia más efectiva frente al ataque de un patógeno (van Wees *et al*, 2000). En determinados casos, el antagonismo entre vías permite controlar la respuesta de defensa de una manera más focalizada y específica. Esta gran multiplicidad de respuestas, como resultado de la

Introducción

activación de diferentes vías de señalización y de las diferentes interconexiones que pueden existir entre ellas, explicaría los efectos de resistencia cruzada observados frente a los diferentes organismos potencialmente agresores de las plantas.

4.3- Los genes *PRms*, *mpi* y *ZmPR4* de maíz

Los genes *PRms*, *mpi* y *ZmPR4* son genes PR de maíz, que han sido identificados y estudiados en el laboratorio, y que pertenecen a las familias PR-1, PR-6 y PR-4 de las proteínas PR, respectivamente. Se describen a continuación las características más importantes de estos genes, cuyos promotores han sido utilizados en este trabajo (capítulo II).

El **gen *PRms* (Pathogenesis-Related maize seed)** fue identificado en el transcurso de un estudio dirigido al análisis y caracterización de genes que se expresan en el periodo de germinación de la semilla de maíz (Casacuberta *et al.* 1991). Así, su expresión se induce en tejidos concretos de la semilla en germinación (la aleurona y el epitelio escutelar), en respuesta a la infección por el hongo *Fusarium verticilloides*. La expresión de este gen responde además a la infección por otros hongos, tanto patogénicos como no patogénicos para maíz, tales como *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Pythium spp.*, *Penicillium spp.*, *Microdochium nivale* y *Trichoderma spp.*, así como por tratamiento con elicitores fúngicos (*F. verticilloides*, *Phytophthora megasperma*) o con moniliformina (toxina producida por el hongo *F. moniliforme* (Casacuberta *et al.* 1991, 1992; Murillo *et al.*, 1999). El promotor del gen *PRms* contiene un elemento regulador en *cis* cuya presencia es suficiente y necesaria para mediar la respuesta a elicitores fúngicos del gen *PRms* así como también del promotor mínimo del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el elemento ERE (Elicitor Responsive Element) (Raventós *et al.*, 1995). El elemento ERE se localiza en la posición -246 del promotor *PRms* con respecto al inicio de la transcripción.

La proteína *PRms* es una proteína de aproximadamente 15.5 kDa y de carácter básico (pI 8,5). La característica más destacable de esta proteína de defensa es su peculiar localización subcelular, ya que se localiza específicamente en los plasmodesmos de tejidos infectados de maíz (Murillo *et al.*, 1997). Los plasmodesmos son canales citoplasmáticos de comunicación entre células contiguas. Inicialmente se pensó que la función de los plasmodesmos era permitir el paso de moléculas pequeñas (de hasta 1000 daltons, aproximadamente). En la actualidad se sabe que los plasmodesmos son estructuras dinámicas capaces de regular el paso de macromoléculas, como son los complejos de ribonucleoproteínas virales, factores de transcripción, etc. (Jackson y Kim, 2003; Lucas y Lee, 2004; Zambryski, 2004). Estudios posteriores llevados a cabo en el laboratorio en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen *PRms*, mostraron que la proteína

PRms presenta la misma localización subcelular en plasmodesmos en las plantas de tabaco-*PRms*.

Los plasmodesmos son la vía de transporte simplástico de la sacarosa, principal fotoasimilado de la planta, entre células del mesófilo de las hojas fotosintéticamente activas (órgano productor) hasta su entrada en el sistema conductor (carga del floema) para su posterior transporte hacia las partes en crecimiento de la planta (órganos consumidores). Los resultados obtenidos del estudio de las plantas de tabaco-*PRms*, indicaron que la presencia de la proteína PRms modifica la estructura y propiedades funcionales de los plasmodesmos entre células del mesófilo, de tal manera que se observa una activación del proceso de descarga de sacarosa a través del pecíolo de las hojas de las plantas de tabaco-*PRms*. Ello además de acelerar el crecimiento de la planta y aumentar la productividad de la misma (biomasa foliar, producción de semillas), determina niveles de acumulación de sacarosa en las hojas jóvenes de la planta superiores a los normales. La sacarosa actúa como molécula señalizadora para la activación de la expresión de genes *PR* endógenos, esto es de la propia planta de tabaco. Como consecuencia, se observa una acumulación "constitutiva" de proteínas PR de tabaco en las plantas transgénicas que confiere protección a la planta frente a infección por patógenos (Murillo *et al*, 2003).

El gen ***mpi*** (**maize proteínase inhibitor**) de maíz, al igual que el gen *PRms*, se expresa en respuesta a infección durante el periodo de germinación de la semilla de maíz (Cordero *et al*, 1992, 1994). Sin embargo, la expresión de ambos genes, *PRms* y *mpi*, está regulada por diferentes señales. Mientras que la inducción del gen *PRms* viene determinada por el reconocimiento molecular del patógeno (respuesta a elicitores), la inducción del gen *mpi* es una consecuencia de la herida que el patógeno produce en el tejido de la planta durante el proceso de infección y colonización (Cordero *et al*, 1994). Así, la herida mecánica y el tratamiento con las hormonas señalizadoras de la respuesta a herida metiljasmonato y ácido abscísico, inducen la acumulación de transcritos del gen *mpi*. La inducción de la expresión del gen *mpi* en respuesta a herida se observa tanto a nivel local como a nivel sistémico en la planta de maíz. En situaciones de ataque por insectos fitófagos, como es el caso de larvas del insecto lepidóptero *Spodoptera littoralis*, también se observa la acumulación rápida de la proteína MPI en los tejidos en los que se alimentan las larvas (Tamayo *et al*, 2000).

El gen *mpi* codifica un inhibidor de proteasas bifuncional con capacidad de inhibición de serín-proteasas digestivas de lepidópteros (*Chilo suppressalis*, *Spodoptera littoralis* *Cacyreus marshalli*) del tipo elastasa y quimotripsina (Tamayo *et al*, 2000). Su expresión en plantas transgénicas de arroz es efectiva para inhibir el crecimiento de las larvas de *C. suppressalis*, no sólo cuando es expresado de manera constitutiva sino también cuando es expresado bajo control de sus propias secuencias reguladoras (promotor y terminador) (Vila

Introducción

et al, 2005). El promotor *mpi*, ha mostrado ser un buen promotor para la expresión regulada del gen insecticida de *Bacillus thuringiensis CryIB* en plantas de arroz, tanto en condiciones controladas de invernadero (Breitler *et al*, 2001) como en ensayos de campo (Breitler *et al*, 2004).

El gen *ZmPR4* codifica una proteína quitinasa de clase II que pertenece a la familia PR-4 de proteínas PR. Su peso molecular y punto isoeléctrico calculados son respectivamente 13,3 kDa y 4,9, tratándose por lo tanto de una proteína ácida (Bravo *et al*, 2003). En embriones infectados con esporas de hongos (*Fusarium verticillioides*, *Penicillium spp*, *Trichoderma spp*), o tratados con elicitores fúngicos o moniliformina, se observa una rápida activación transcripcional del gen *ZmPR4*. Su expresión no se ve afectada por tratamientos con ácido acetil salicílico (SA) o ácido giberelico (GA), pero sí por ácido abscísico (ABA) y metil jasmonato (JA). También se observa un aumento rápido y considerable de los niveles de RNAm del gen *ZmPR4* en respuesta a herida, niveles que se mantienen estables hasta por lo menos 24 horas después de la herida. La respuesta múltiple observada en el caso del gen *ZmPR4* probablemente se debe a una convergencia entre el reconocimiento molecular del patógeno (inducibilidad por elicitores), y la herida causada por su penetración en tejido al que infecta. En ensayos de hibridación *in situ* en embriones aislados en germinación, se pudo localizar una expresión del gen *ZmPR4* en el epitelio y en las capas más externas de las células del parénquima del escutelo. Este patrón de expresión mostró ser el mismo que para el gen *mpi*, pero diferente del gen *PRms* (la expresión del gen *PRms* se observó en el epitelio del escutelo pero no en células del parénquima escutelar). La expresión localizada en las capas celulares exteriores del escutelo (epitelio y parénquima) puede significar que esta quitinasa tenga un papel directo en la defensa de la semilla frente al ataque por patógenos, ya que estos son los primeros tipos celulares invadidos por el hongo *F. verticillioides*.

4.4- Otras proteínas antimicrobianas de plantas

Además de las proteínas PR descritas en el apartado 4.1 de este trabajo, se han descrito otras proteínas con actividades antimicrobianas de plantas, que no han sido incluidas dentro de la clasificación de proteínas PR. Un ejemplo es la **heveína**, la proteína más abundante del árbol productor de látex, *Hevea brasiliensis*. La heveína es una proteína rica en glicina y prolina, que tiene la capacidad de unirse a quitina o a oligómeros de N-acetilglucanos. Como otras muchas proteínas antimicrobianas, presenta un tamaño reducido (43 aminoácidos) y posee 8 cisteínas que forman los 4 puentes disulfuro responsables por su estabilidad estructural (Van Damme *et al*, 1999). Debido a su capacidad de unirse a carbohidratos, la heveína también se considera una lectina. Así, las proteínas que presentan uno o más dominios de tipo heveína se clasifican dentro de la superfamilia de las lectinas.

Se propuso que la actividad antifúngica de estas proteínas de basa en su capacidad de unirse a quitina. Sin embargo, Os y colaboradores (2003) demostraron que dos proteínas de tipo heveína de *Pharbitis nil* presentan actividad antifúngica *in vitro*, tanto frente a hongos que tienen quitina en su pared celular, como frente a hongos que no la tienen. Ello indica que la presencia de quitina no es fundamental para que estas proteínas ejerzan su efecto antifúngico. Estos mismos autores han obtenido también plantas transgénicas de tomate sobreexpresando una de estas dos heveínas, que se mostraron resistentes al ataque de hongos, con o sin quitina en su pared celular.

Las proteínas inactivadoras de ribosomas, o **RIPs**, son un grupo de enzimas con actividad N-glicosidasa que hidrolizan los rRNAs en un residuo específico de adenina que se encuentra muy conservado en la subunidad mayor de los ribosomas (28S en mamíferos, 26S en plantas y hongos, y 23S en bacterias). Liberan un fragmento de RNA conocido como fragmento- α de 240 a 500 nucleótidos según la especie (Endo *et al*, 1987). Esta modificación irreversible impide la unión de los factores de elongación EF-1 en el caso de eucariotas y EF-TG en procariotas, bloqueando la traducción y llevando a la muerte celular (Jensen *et al*, 1999; Hartley y Lord, 2004). Todas las proteínas RIPs presentan una estructura tridimensional muy conservada alrededor de la región catalítica, esencial para la unión al sustrato (Chen *et al*, 1997). Se clasifican en 3 grupos: tipo 1) de simple cadena (entre 11 y 30 kDa); tipo 2) formadas por dos subunidades peptídicas unidas por un puente disulfuro. La cadena A es homóloga a las proteínas RIP de tipo 1, con actividad N-glicosidasa, mientras que la cadena B presenta propiedades de lectinas y especificidad por galactosa (cerca de 60 kDa); y tipo 3) formada por una única cadena que contiene un dominio adicional en su extremo carboxi terminal (Selitrennikoff, 2001; Stirpe, 2004; Mi *et al*, 2005). Hasta la fecha se han identificado proteínas RIP en diversas especies vegetales, incluyendo monocotiledoneas y dicotiloedoneas, aunque las proteínas de tipo 3 solo se han descrito en monocotiledoneas (Jensen *et al*, 1999; Nielsen y Boston, 2001; Pelosi, 2005). Se han detectado en diferentes órganos y tejidos, como endospermo, frutos, raíces y hojas, y algunas muestran una regulación dependiente del desarrollo o específica de tejido (Jensen *et al*, 1999; Stirpe, 2004). Aunque sean mayoritariamente vegetales, también se han descrito algunas proteínas de tipo RIP en hongos, como es el caso de la proteína tricolina del hongo *Thichoderma viride*, y las proteínas gigantina y α -sarcina, aisladas del hongo del suelo *Aspergillus giganteus* (Lin *et al*, 1991; Lin *et al*, 1994; Salvarelli *et al*, 1994; Ng, 2004).

Dada su gran toxicidad, se postulan dos funciones principales para las proteínas RIP: como inductoras de muerte celular programada, y/o como proteína de defensa frente a herbívoros o patógenos, aunque se hayan propuesto también actividades RNasa y DNasa, superóxido dismutasa o fosfolipasa (Jensen *et al*, 1999; Park *et al*, 2004). Las proteínas RIPs son en su mayoría sintetizadas en una forma inactiva de preproteína y secretadas al

Introducción

espacio extracelular. Una vez fuera de la célula, se activan por la acción de enzimas proteolíticas. De esta manera las células productoras se autoprotegen de su actividad ribonucleásica (Jensen *et al*, 1999; Veronese *et al*, 2003; Stirpe, 2004). Penetran en las células diana por endocitosis mediada por interacciones con la membrana plasmática, y llevan a la muerte celular a través de la inducción de apoptosis como causa directa de su actividad catalítica en los ribosomas. Así, se ha demostrado una actividad antifúngica para proteínas RIP de melón (hispin) (Ng y Parkash, 2002), de maíz (Nielsen *et al*, 2001), y de ginseng (Ng y Wang, 2001); además de una doble función fungicida y bactericida para dos proteínas RIP de *Mirabilis expasa* (Vivanco *et al*, 1999), y para una RIP de tabaco (Sharma *et al*, 2004). También se demostró un efecto sinérgico entre una proteína RIP de la hierba carmín (*Phytolacca americana*) y otras proteínas de defensa como quitinasas, β -glucanasas y proteasas (Park, S-W. *et al*, 2002), y entre una quitinasa de clase II y una RIP de cebada en plantas transgénicas de tabaco (Jach *et al*, 1995). Las proteínas RIP se han utilizado con éxito para la obtención de plantas transgénicas resistentes a patógenos. La sobreexpresión de la proteína IRIP de iris en tabaco permitió obtener plantas resistentes al virus del mosaico del tabaco (Desmyter *et al*, 2003; Vandenbussche *et al*, 2004). En otro trabajo, se obtuvieron plantas de arroz resistentes al hongo *Rhizoctonia solani* mediante la expresión constitutiva de una proteína RIP de maíz en combinación con una quitinasa de arroz. Sin embargo, hay que destacar que estas mismas plantas no presentaron resistencia significativa frente a los hongos *Bipolaris oryzae* y *Magnaporthe grisea* (Kim *et al*, 2003). Además, generalmente las proteínas de tipo RIP presentan cierto grado de toxicidad, lo que limita su aplicación para la obtención de plantas transgénicas (Jensen *et al*, 1999).

Las proteínas tipo "**Knottin**" comprenden una familia de proteínas pequeñas (25-35 aminoácidos), cuya estructura tridimensional se caracteriza por una peculiar disposición de 3 puentes disulfuro, donde uno de ellos atraviesa el círculo formado por los otros 2 (Rees y Lipscomb, 1982). Ésta es la característica estructural que agrupa a todas las proteínas tipo "knot", ya que no presentan gran homología a nivel de secuencia. La primera proteína con estas características a ser descrita fue aislada de patata, un inhibidor de carboxipeptidasas (PCI). Las proteínas "knottin" tienen varias funciones biológicas, y aunque todavía no se haya demostrado, parece ser que ejercen su acción por la interacción con receptores, ya sean proteínas, azúcares o lípidos (Skerra, 2000; Gelly *et al* 2004). Para la proteína PAFP aislada de semillas de *Phytolacca americana* (Shao *et al*, 1999), y para 4 proteínas de tipo "Knot" aisladas de plantas de café (Tam *et al*, 1999) se ha descrito una actividad antimicrobiana.

En 1997, Tailor y colaboradores aislaron 4 péptidos de semillas de *Impatiens balsamina*, y los denominaron **Ib-AMP** 1, 2, 3 y 4. Son muy básicos y tienen 4 residuos de cisteína que forman 2 puentes disulfuro. Estos péptidos, muy relacionados entre sí,

mostraron tener la capacidad de inhibir el crecimiento de diversos hongos y bacterias, no presentando ninguna toxicidad frente a células humanas. Constituyen el grupo de péptidos antimicrobianos de plantas más pequeños que se conoce, con una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos (2-3 kDa) (Tailor *et al*, 1997; de Lucca y Walsh, 1999). La caracterización molecular de sus cDNAs reveló que los 4 péptidos estaban codificados por un único transcrito. Se sintetizan en forma de una proteína precursora que se procesa para dar lugar a los 4 péptidos Ib-AMP (Tailor *et al*, 1997). El mecanismo de acción de estos péptidos no se conoce.

En tubérculo de patata se han identificado unos péptidos antimicrobianos que responden a infección, o "**snakins**". Son péptidos de aproximadamente 7 kDa, muy básicos y ricos en cisteína. Tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos a bajas concentraciones (10 μ M). Se encuentran también en tejidos no infectados, sugiriendo que pueden representar una defensa constitutiva de la planta (Segura *et al*, 1999; Berrocal-Lobo *et al*, 2002).

Las **puroindolinas** son otro tipo de proteínas antimicrobianas, relacionadas con las LTPs, por homología de secuencia, y con las tioninas. Tienen un peso molecular de cerca de 13 kDa, 5 puentes disulfuro estabilizando la estructura de α -hélice, y una región rica en triptófano. Son proteínas exclusivas de la familia Triticeae (Krishnamurthy *et al*, 2001). Se encuentran en el endospermo de semillas de trigo, cebada y avena; y así como otras proteínas, son capaces de desestructurar la membrana plasmática provocando la muerte celular (Charnet *et al*, 2003). Por esta característica y por la similitud con otras proteínas antimicrobianas, se ha propuesto que las puroindolinas también podrían estar participando en las respuestas de defensa de las plantas. Efectivamente, Dubreil y colaboradores (1998) mostraron la actividad antifúngica de una puroindolina *in vitro*, y plantas transgénicas de arroz expresando una puroindolina de trigo resultaron resistentes a la infección por los hongos *Magnaporthe grisea* y *Rhizoctonia solani* (Krishnamurthy *et al*, 2001).

Finalmente, cabe mencionar que las plantas producen inhibidores de poligalacturonidasas (PGIPs), glicoproteínas que se localizan en la pared celular vegetal y que inhiben específicamente a poligalacturonidasas producidas por hongos. Los poligalacturanos, componentes estructurales de la pared vegetal, representan una de las dianas de los hongos fitopatógenos en los primeros estadios de la infección. Esta capacidad de inhibir la actividad de las poligalacturonidasas fúngicas hace que se haya propuesto a los inhibidores de poligalacturonidasas vegetales como componentes de la respuesta de defensa de las plantas.

5- Proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana de origen no vegetal

La inmunidad innata es una de las estrategias de defensa más antiguas utilizadas por los organismos multicelulares para combatir la infección por patógenos. Esta estrategia incluye, entre otras respuestas, la producción de sustancias con actividad antimicrobiana como son el peróxido de hidrógeno, las enzimas hidrolíticas, y los péptidos antimicrobianos (AMPs, de *antimicrobial peptides*). Estos péptidos antimicrobianos, en general, presentan un amplio espectro de acción (Thevissen *et al*, 1997; Theis y Stahl, 2004). La distribución de las AMPs entre organismos tan diversos como plantas, vertebrados, insectos, hongos y bacterias, sugiere que estas proteínas tuvieron un papel fundamental en la evolución, y que siguen siendo elementos importantes de las respuestas de defensa (Zasloff, 2002). La diversidad de estas proteínas y/o péptidos con actividad antimicrobiana que se han identificado hasta la fecha es enorme, con más de 800 representantes (una lista detallada se puede consultar en <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>). Se agrupan según sus características bioquímicas y estructurales en dos grandes grupos: las proteínas/péptidos aniónicos y los catiónicos. El primer grupo es el más pequeño y comprende principalmente péptidos aislados de mamíferos, como moléculas derivadas de neuropéptidos, dipéptidos aromáticos o proteínas que se unen a oxígeno (Marshall y Arenas, 2003). El grupo de las proteínas/péptidos catiónicos es el más grande y el mejor caracterizado, incluyendo péptidos ampliamente distribuidos en los diferentes reinos.

Las proteínas/péptidos antimicrobianos catiónicos se caracterizan por su capacidad de adoptar una estructura en forma de hélice- α como es el caso por ejemplo de las cecropinas de insectos. En otros casos, presentan estructuras muy compactas con dominios de hojas- β y varios puentes disulfuro que estabilizan su estructura, como por ejemplo las defensinas de insectos. En general son péptidos pequeños (< 6kDa) y muy básicos, presentando carga positiva a pH fisiológico. La mayoría de los péptidos antimicrobianos estudiados hasta el momento ejercen su actividad por su interacción con los fosfolípidos de la membrana a través de un mecanismo basado en las cargas, lo que explica su amplio espectro de acción (Hwang y Vogel, 1998; Thevissen *et al*, 2004). La diferente composición de membrana de las células animales y vegetales con respecto a microorganismos explica las diferencias de susceptibilidad frente a este tipo de proteínas antimicrobianas. A diferencia de animales y plantas, que tienen los lípidos de membrana cargados negativamente orientados hacia el lado citoplasmático, las membranas de bacterias y hongos tienen la capa exterior de su membrana bilipídica formada por lípidos cargados negativamente (Zasloff, 2002).

Actualmente el modelo más aceptado de interacción entre los péptidos formadores de α -hélices y las membranas plasmáticas de los organismos afectados por ellos es el modelo SMH (Shai-Matsuzaki-Huang) (fig. 9) (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang, 2000). Este

modelo propone la interacción del péptido con la membrana, seguido por un desplazamiento de lípidos que desestabiliza su estructura y conduce a la formación de poros en la membrana y muerte celular por pérdida de iones y material citoplasmático (Sazloff, 2002). El colesterol presente en la membrana de los mamíferos reduce el efecto de estos péptidos ya sea por una estabilización de la membrana o por una interacción directa con el péptido (Matsuzaki, 1999). En algunos casos el péptido puede entrar en la célula y afectar dianas intracelulares concretas. En líneas generales, las etapas propuestas en este modelo y que se presentan en la figura 9 son: **1)** los péptidos (cargados positivamente) interaccionan con los fosfolípidos de las membranas de bacterias y hongos (interacciones electrostáticas e hidrofóbicas), adoptando su estructura de α -hélice. **2)** una vez unidos a la membrana, y dependiendo de cada péptido, de su concentración en el medio y de la composición lipídica de la membrana, se produce la formación de poros por uno u otro de los siguientes mecanismos: **a)** a través de la formación de una estructura de tipo "alfombra" o **b)** directamente haciendo canales en la propia estructura de la membrana ("poro-canal"). En el primer caso, los péptidos se unen a la superficie de la membrana formando una especie de "alfombra", aumentando el grosor y la tensión en la capa exterior de la bicapa lipídica (fig. 9a). Como consecuencia de esta tensión la membrana se desestabiliza y desestructura, formando en un primer momento poros transitorios (poros toroidales) que permiten el transporte de lípidos de la capa exterior hacia la interior y viceversa. El péptido antimicrobiano en este momento puede penetrar en la célula para interaccionar con una diana intracelular, si fuera el caso. La presencia de estos poros transitorios, y posteriormente de poros definitivos lleva a una desestructuración física de la membrana que culmina con la muerte celular. En el segundo caso, la inserción del péptido multimerizado en la bicapa lipídica puede dar lugar a la formación de poros ("poro-canal") (fig. 9b). A través de este poro se pierde el contenido citoplasmático. Puede asimismo producirse la entrada de péptido antimicrobiano.

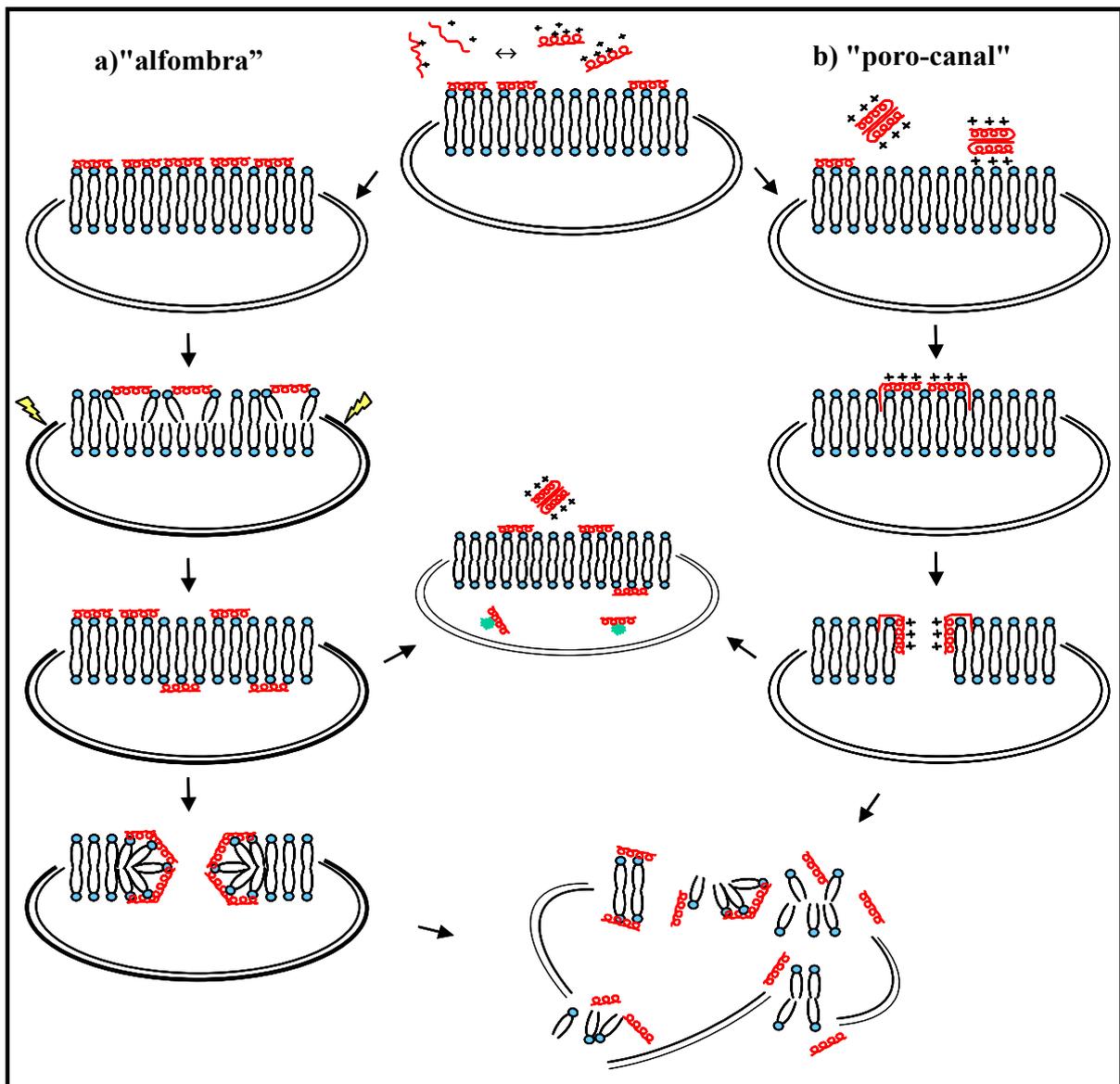


Figura 9: Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con estructura de α -hélice, según el modelo SMH. (Adaptado de Zasloff, 2002; Theis y Stahl, 2004).

En general, los péptidos catiónicos derivan de precursores más grandes que contienen péptidos señal, y sufren modificaciones postraduccionales tales como procesamiento proteolítico, glicosilaciones y amidaciones, entre otros (Zasloff, 2002). Con base en sus características estructurales, se pueden agrupar en tres grandes clases: **1)** péptidos lineales formando estructuras de α -hélice, **2)** péptidos lineales sin α -hélice, ricos en aminoácidos específicos, como prolina, glicina, histidina y triptófano, y **3)** péptidos ricos en cisteínas y con 1 o más puentes disulfuro (tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de los péptidos antimicrobianos catiónicos según su estructura. Se citan algunos ejemplos de cada clase (Adaptado de Zasloff, 2002 y Marshall y Arenas, 2003).

	Organismo	Actividad antimicrobiana
Lineales con α -hélice cecropina A magainina 2 buforinas	insectos anfibios anfibios	bacterias, hongos, virus bacterias, protozoos bacterias, hongos
Lineales sin α -hélice indolicina histatina shepherin I y II <i>pyrrhocoricin</i>	mamíferos humanos plantas insectos	bacterias bacterias, hongos bacterias, hongos bacterias, hongos
Ricos en cisteínas 1 puente disulfuro thanatin brevinina lanthionin	insectos anfibios bacterias	bacterias, hongos bacterias bactétias
2 puentes disulfuro androctonina tachyplesin protegrina	artrópodos crustáceos mamíferos	bacterias, hongos bacterias, hongos, virus bacterias, hongos, virus
3 puentes disulfuro tioninas α , β y θ defensinas defensinas penaeidinas	plantas mamíferos insectos crustáceos	bacterias, hongos bacterias, hongos bacterias, hongos, protozoos bacterias, hongos
4 puentes disulfuro drosomicina defensinas	insectos plantas	hongos bacterias, hongos

Como muestra la tabla anterior, existe una gran variedad de péptidos antimicrobianos en los más diversos organismos. En muchos casos, un organismo produce varios de estos AMPs al mismo tiempo, muy probablemente con el fin de defenderse de manera más efectiva frente al ataque por patógenos.

Aunque esté ampliamente aceptado que las proteínas y péptidos antimicrobianos ejercen su actividad a través de la permeabilización de la membrana plasmática, cada vez toma más fuerza la hipótesis de que estas proteínas también puedan tener dianas intracelulares (DNA, RNA y proteínas). La permeabilización de membrana seguida de internalización en la célula permitirían a estas proteínas/péptidos antifúngicos alcanzar sus dianas intracelulares (Wu *et al*, 1999; Xiong *et al*, 1999; Friedrich *et al*, 2000; Thomma *et al*, 2002). Por ejemplo las apidaecinas, péptidos ricos en prolina y arginina, interaccionan con la membrana y penetran en las células bacterianas. Una vez en el interior de la célula afectan la síntesis de proteínas (Castle *et al*, 1999). En el caso de algunas defensinas

Introducción

aisladas de cebada, se sabe que tienen la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas tanto en eucariotas como en procariontes, reforzando la teoría de dianas intracelulares para las defensinas vegetales (Mendez *et al*, 1996). En cualquier caso, resulta de su interacción con la pared/membrana, con dianas intracelulares, o es el resultado de ambas actividades (Theis y Stahl, 2004).

Se describen a continuación las características más importantes de algunos péptidos antimicrobianos identificados en insectos, anfibios y humanos.

Las **cecropinas** de insectos componen una familia de péptidos lineales de 3-4 kDa con 2 dominios claramente diferenciados en su cadena polipeptídica: un dominio N-terminal fuertemente básico con capacidad de formar una α -hélice anfipática, y un dominio C-terminal altamente hidrofóbico (Marshall y Arenas, 2003; Bulet y Stocklin, 2005). La primera cecropina (cecropina A) se aisló a finales de los años 80 de la hemolinfa de la mariposa nocturna *Hyalophora cecropia* (Boman y Hultmark, 1987), y mostró una importante actividad frente a bacterias (tanto gram-positivas como negativas) y frente a hongos, pero no frente a células eucariotas (a concentraciones de 0,1-5 μ M) (Sharma *et al*, 2000). La estructura tridimensional de estas proteínas es fundamental para su actividad antimicrobiana. La cecropina A ha demostrado ser muy efectiva, a bajas concentraciones, frente a hongos fitopatógenos de gran importancia (Powell *et al*, 1995; Cavallarini *et al*, 1998; Vila *et al*, 2001). Plantas transgénicas de arroz expresando constitutivamente una cecropina B mostraron resistencia frente a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Sharma *et al*, 2000). De la misma forma, la expresión constitutiva de la cecropina A ha permitido obtener plantas de arroz resistentes al hongo *Magnaporthe grisea* (Coca *et al*, 2005).

La **melitina** es el principal componente del veneno de las abejas. Es un péptido de 26 aa que adopta una conformación de α -hélice anfipática. Presenta una fuerte actividad antifúngica y antibacteriana, pero también es tóxica frente a células de eucariotas superiores (Hancock y Diamond, 2000), y frente a virus de plantas (Marcos *et al*, 1995).

La **buforina II** (21 aa) es un péptido con una fuerte actividad antimicrobiana que deriva de la buforina I (39 aa), aislado del estómago del sapo asiático *Bufo bufo garagrizans*. La buforina II presenta una estructura anfipática compuesta por 2 hélices separadas por un residuo de prolina. Comparado con otras proteínas antimicrobianas con estructura de α -hélice, tiene una actividad antimicrobiana más fuerte y frente a un espectro más amplio de patógenos (Park *et al*, 2000). Se ha visto que este péptido tiene la capacidad de translocarse hacia el interior de las células y que se une fuertemente a moléculas de DNA y RNA (Park *et al*, 1998). Otro grupo de péptidos con actividades antimicrobianas aislados de anfibios son las **magaininas**. Son péptidos de 22-24 aminoácidos, y su modo de acción también se basa en la desestructuración de la membrana de los patógenos. Su actividad

antimicrobiana se ha utilizado para obtener plantas transgénicas de tabaco resistentes al ataque de hongos y bacterias (DeGray *et al*, 2001; Li *et al*, 2001).

Entre los péptidos lineales no formadores de α -hélice, se encuentra la **histatina**, rica en residuos de histidina, y que forma parte de la saliva de humanos y primates. Esta proteína es capaz de translocarse al interior de la célula e interactuar con las mitocondrias (Helmerhorst *et al*, 1999).

Además de los estudios dirigidos a la búsqueda de péptidos antimicrobianos naturales, se ha trabajado intensamente en el diseño y síntesis de nuevos péptidos derivados de los péptidos naturales, más potentes frente a patógenos, y no tóxicos frente a células de plantas o mamíferos. Esto ha permitido la identificación de **péptidos sintéticos** con una actividad antimicrobiana más amplia y efectiva que los péptidos naturales a partir de los cuales fueron diseñados (Marcos *et al*, 1995; Powell *et al*, 1995; Cavallarin *et al*, 1998; Ali y Reddy, 2000). Ello ha venido a ampliar el repertorio de genes antimicrobianos potencialmente aplicables a la protección de plantas. Así, plantas transgénicas de tabaco expresando un gen derivado de la cecropina B mostraron resistencia frente a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Huang *et al*, 1997). En otro trabajo, se obtuvieron plantas de tabaco resistentes a hongos mediante expresión inducible de un gen-fusión de los genes cecropina A y melitina ("CEMA"). El péptido híbrido resultante mostró una fuerte actividad antimicrobiana, y las plantas transgénicas un alto nivel de protección frente a patógenos (Yevtushenko *et al*, 2005). Este mismo péptido híbrido se había utilizado antes para la obtención de plantas de patata transgénicas resistentes frente a hongos (Osuky *et al*, 2000). En la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, la química combinatorial proporciona métodos eficientes para el análisis rápido de grandes colecciones de péptidos (bibliotecas sintéticas combinatoriales), siendo ésta una manera de identificar una infinidad de nuevas moléculas. Este método se ha utilizado con éxito para la identificación de péptidos con una gran actividad frente a hongos fitopatógenos (Reed *et al*, 1997; López-García, 2000, 2002, 2003), y también para la obtención de plantas transgénicas resistentes (Cary *et al*, 2000).

5.1- Proteínas antimicrobianas producidas por microorganismos del suelo

Los hongos micoparásitos del género *Trichoderma*, están siendo empleados desde hace tiempo para el control biológico de algunos patógenos (Rey *et al*, 2000; Harjono y Widyastuti, 2001). Se sabe que estos hongos producen enzimas hidrolíticas, como endo y exoquitinasas, β -1,3-glucanasas y proteinasas, enzimas que degradan la pared celular de otros hongos, y que actúan de manera sinérgica en el proceso de parasitismo (Lorito *et al*, 1994, 1996). *Trichoderma* y otros hongos micoparásitos del suelo pueden representar una

Introducción

buena fuente de genes antimicrobianos que pueden ser aplicables a la obtención de plantas transgénicas resistentes a enfermedades. En este sentido, se han obtenido ya plantas de patata y tabaco expresando una quitinasa de *Trichoderma* resistentes a la infección por hongos (Lorito *et al*, 1998).

Por otra parte, el hongo del suelo *Aspergillus giganteus* se sabe que produce y secreta al espacio extracelular dos proteínas mayoritarias en forma de preproteína, la α -sarcina y la AFP (ver apartado 5.2) (Olson y Goerner, 1965). La α -sarcina es una proteína con actividad ribonucleásica de tipo RIP que se internaliza en las células diana vía endocitosis y actúa hidrolizando una unión fosfodiéster específica en la subunidad mayor del RNA ribosomal (Gasset *et al*, 1994; Olmo *et al*, 2001). Como resultado, se afecta la interacción entre los factores de elongación 1 y 2 y se bloquea la síntesis de proteínas (Endo y Wool, 1982; Endo *et al*, 1983). La α -sarcina hidroliza este sitio específico del ribosoma de todos los procariotas y eucariotas analizados hasta la fecha, incluso del propio hongo productor *A. giganteus*, debido a la gran conservación de secuencia que presenta la región del RNA ribosomal (Martínez-Ruiz *et al*, 1998; Miller y Bodley, 1988). La α -sarcina se sintetiza en forma de preproteína que se activa por la acción de proteasas en el espacio extracelular. Ello protege el hongo *A. giganteus* de su acción tóxica (Endo *et al*, 1993). Además de su actividad enzimática hidrolizando el ribosoma, la α -sarcina es capaz de interactuar con membranas lipídicas promoviendo su fusión y ruptura, siendo capaz también de translocarse al interior de vesículas lipídicas (Gasset *et al*, 1994; Siemer *et al*, 2004). Finalmente, la α -sarcina es una proteína citotóxica activa frente a diferentes líneas tumorales humanas (Turnay *et al*, 1993), pero no presenta actividades antibacterianas o antifúngicas muy significativas (Olson y Goerner, 1965).

Otra proteína producida por el hongo del suelo *A. giganteus* es la proteína AFP (ver más adelante, apartado 5.2).

Serratia marcescens, una bacteria gram-negativa del suelo, produce una quitinasa, la quitinasa A (**chiA**), enzima responsable de la degradación de la quitina, principal componente de la pared celular de muchos hongos. Se han obtenido plantas transgénicas de tabaco resistentes a *R. solani* por la expresión de un gen de ChiA (Howie *et al*, 1994).

Aunque no sean proteínas antimicrobianas, sino insecticidas, cabe mencionar las proteínas **Cry** de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*. Estas proteínas (conocidas como Bt), se han utilizado ampliamente para la obtención de plantas transgénicas resistentes a insectos. En un estudio con larvas del insecto *Spodoptera littoralis* se pudo comprobar el efecto sinérgico entre la quitinasa ChiA de *S. marcescens* y la toxina Cry de *B. thuringiensis*, donde probablemente la acción de la quitinasa sobre la membrana peritrófica del trato digestivo de los insectos abría el paso y facilitaba el acceso de la toxina Cry a sus receptores en las células epiteliales (Regev *et al*, 1996).

5.2- La proteína AFP (*Antifungal Protein*) de *Aspergillus giganteus*

La proteína AFP es una proteína secretada por el hongo del suelo *Aspergillus giganteus*, y como ocurre en muchos hongos antagonistas y micoparásitos, se piensa que es resultado de una adaptación evolutiva que proporciona ventajas a *A. giganteus* en su interacción con otros hongos competidores de su hábitat. Fue identificada en los años 60 en Michigan (EUA) durante un trabajo de búsqueda de compuestos con actividades antitumorales (Olson y Goerner, 1965). En 1990 se describió su secuencia aminoacídica y algunas características bioquímicas (Nakaya *et al*, 1990). Se trata de una proteína muy pequeña (5,78 kDa), de 51 aminoácidos y un gran contenido en residuos de lisina y tirosina, 6 y 12 respectivamente, lo que hace que sea muy básica, con un punto isoeléctrico de 10,65. Posee una estructura muy compacta con 8 residuos de cisteína que forman 4 puentes disulfuro.

El gen que codifica esta proteína contiene una pauta abierta de lectura de 282 nt que codifica una proteína precursora, estando interrumpida por dos intrones, de 89 y 56 nt. La forma precursora de la proteína AFP (preproteína de 94 aminoácidos), contiene una secuencia N-terminal o péptido señal de entrada en la vía de secreción, seguida de una pro-secuencia (del aa 27 hasta el aa 43) que tras su procesamiento da lugar a la proteína AFP madura de 51 aa. La existencia de esta forma precursora permite mantener a la proteína en su estado inactivo hasta su procesamiento por proteasas extracelulares (Wendt *et al*, 1994; Martínez-Ruiz *et al*, 1997). Así, la presencia de la pro-secuencia, además de permitir el correcto plegamiento de la proteína tiene una función de autoprotección para el organismo productor, *A. giganteus*, (la proteína solamente es activa una vez fuera de la célula) (Marx, 2004). El genoma de *Aspergillus giganteus* contiene una única copia del gen *afp*.

Se han descrito proteínas homólogas a la AFP en otros hongos. La proteína que presenta más homología con la AFP es una proteína sintetizada por el hongo *Penicillium chrysogenum*, la proteína PAF (*P. chrysogenum* antifungal protein) (Vollebregt *et al*, 1994; Marx *et al*, 1995, Kaiserer *et al*, 2003). Al igual que la AFP, también se sintetiza en forma de preproteína de 92 aminoácidos, que se procesa dando lugar a una proteína madura de 55 aas. La identidad que se observa entre ambas proteínas maduras es del 42,6% (Martínez-Ruiz *et al*, 1997). Otra proteína con homología significativa a la AFP, es la proteína Anafp, secretada por el hongo *Aspergillus niger*, que presenta un 31% de identidad con la AFP (Lee *et al*, 1999). Un dato interesante es la presencia de un gen silenciado, idéntico al gen *afp*, pero sin los 2 intrones, en el hongo *Trichoderma viride* (Hao *et al*, 2000). Al ser introducido en células de *Escherichia coli*, este gen se transcribe correctamente y da lugar a una proteína AFP funcional.

Introducción

La estructura tridimensional de la proteína se determinó por resonancia magnética nuclear (RMN) (Campos-Olivas *et al*, 1995). Está compuesta por 5 hojas β antiparalelas estabilizadas por 4 puentes disulfuro, definiendo una estructura muy compacta (fig. 10). La estructura de la proteína AFP es similar a la que presentan las defensinas y tioninas de plantas (ver apartado 4.1, familias PR12 y 13).

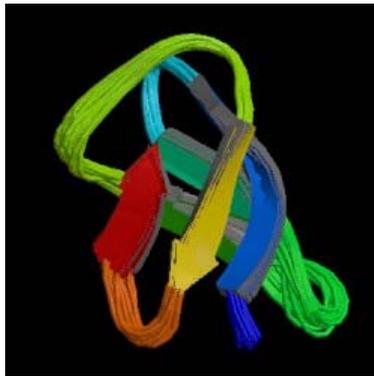


Figura 10: Estructura tridimensional de la proteína AFP (en rojo, amarillo, azul y verde oscuro, las 5 hojas β). (Tomado de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics-ProteinDataBank (RCSB-PDB).

(<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1afp>)

Esta estructura tan compacta es probablemente la responsable de que la AFP sea una proteína altamente resistente a la digestión por proteasas (proteasa SV-8, tripsina, pepsina y termolisina). Esta resistencia a la proteólisis es una propiedad importante para una proteína que es secretada al espacio extracelular donde la presencia de enzimas proteolíticas es muy frecuente. Además, también se ha visto que la conformación de AFP se mantiene estable a altas temperaturas (manteniendo su funcionalidad hasta 80°C), y en condiciones de pH extremas (pH de 3 a 8) (Campos-Olivas *et al*, 1995; Lacadena *et al*, 1995).

La secuencia de aminoácidos de la proteína AFP presenta una región catiónica formada por 3 lisinas adyacentes a una región hidrofóbica compuesta por 3 residuos de tirosina y una valina, ambas en la superficie de la proteína. Ello puede representar un sitio potencial de unión a fosfolípidos, donde la región catiónica se uniría a iones fosfato mientras que la hidrofóbica interaccionaría con la región hidrofóbica de los fosfolípidos. Para comprobar esta hipótesis, Lacadena y colaboradores (1995) realizaron experimentos de unión a vesículas formadas por fosfolípidos ácidos de DMSP (dimiristoilfosfatidil-serina). Se pudo comprobar que la AFP es capaz de interaccionar con estos fosfolípidos y de producir agregación de las vesículas. Sin embargo en vesículas compuestas de fosfolípidos neutros, la

presencia de AFP no produce ningún efecto. Esta observación sugería que en el proceso de unión de AFP a fosfolípidos podrían estar implicadas interacciones electrostáticas.

Por otra parte, la estructura tridimensional de la proteína AFP muestra una gran similitud con los motivos de unión a oligonucleótidos y oligosacáridos ("OB fold") presentes en otras proteínas, a pesar de la ausencia de una homología de secuencia significativa a nivel de la proteína entera. Mediante ensayos de interacción *in vitro*, se pudo comprobar la capacidad de AFP de interactuar con DNAs tales como el DNA de cadena sencilla del bacteriófago F1 o el DNA de timo de ternera, y de provocar la condensación de los mismos (Martínez del Pozo *et al*, 2002).

Se ha demostrado la actividad antifúngica de la proteína AFP frente a hongos filamentosos con valores de inhibición total del crecimiento (valores MIC) en el rango de 6 a 25 μM . Frente al hongo *Thricoderma harzianum*, el valor MIC fue de 127 μM , mientras que frente a otros hongos (p. e. *Penicillium frequentans* y *Aspergillus flavus*) esta proteína no mostró ningún efecto antifúngico (Lacadena *et al*, 1995). La AFP no tiene ningún efecto frente a bacterias y levaduras, ni tampoco sobre el hongo del cual se origina, *A. giganteus*. En ensayos con los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*, productores de las proteínas antifúngicas PAF y Anafp respectivamente, la AFP no mostró ningún efecto antifúngico (Lacadena *et al*, 1995).

Estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio mostraron la capacidad de la proteína AFP para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, *Magnaporthe grisea* y *Fusarium moniliforme*, así como del oomiceto *Phytophthora infestans*, siendo las concentraciones MIC encontradas de 4 μM , 100 nM y 10 μM , respectivamente (Vila *et al*, 2001). La aplicación directa de la proteína AFP previamente a la infección con esporas de *M. grisea* también mostró un efecto protector frente a la infección en plantas de arroz.

6- Plantas transgénicas resistentes a patógenos

La biotecnología aplicada a la protección de plantas frente a enfermedades representa una alternativa atractiva para la agricultura, complementando así las técnicas clásicas de mejora genética dirigidas a la obtención de cultivos resistentes. El desarrollo de plantas transgénicas puede ser de gran utilidad en el contexto del control de enfermedades, sobretodo en aquellos casos en los que éstas no son eficientemente controladas por los métodos tradicionales.

La mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha con la finalidad de obtener plantas transgénicas resistentes a hongos patógenos se basa en la utilización de promotores constitutivos para dirigir la expresión de genes antifúngicos. Estos promotores han demostrado ser efectivos en la obtención de plantas transgénicas con resistencia frente a

Introducción

diversos patógenos (Gao *et al*, 2000; Coca *et al*, 2004). Sin embargo, la utilización de estos promotores no es la estrategia más adecuada cuando se trata de plantas destinadas al consumo humano o animal. En estos casos es deseable que el producto del transgén se encuentre sólo en los tejidos y en los momentos en que se necesita su presencia, esto es, en los tejidos que se encuentran infectados por el patógeno. El aspecto más importante a considerar en el caso de cultivos destinados al consumo humano o animal, es el hecho de que el producto del transgén no debe acumularse en los órganos de la planta destinados al consumo. De ahí la importancia de la identificación de promotores capaces de regular la expresión de un transgén de manera específica en tejidos concretos (Stuiver y Custers, 2001).

En lo que se refiere a los cereales, existe una clara necesidad de encontrar promotores con estas características que sean capaces de dirigir la expresión de transgenes que confieren a la planta propiedades de resistencia frente a diferentes patógenos pero que sean inactivos en semilla (Altpeler *et al*, 2005). En trigo, se han utilizado promotores constitutivos para la obtención de plantas resistentes a hongos. Oldach y colaboradores (2001) obtuvieron plantas bien expresando una quitinasa de clase II de cebada, bien gen *afp* de *Aspergillus giganteus*. En ambos casos las plantas mostraron niveles de resistencia aumentados entre un 40 y 50% frente a los hongos *Erysiphe graminis* y *Puccinia recondita*. En otro estudio también se obtuvieron plantas resistentes, en este caso frente al hongo *Blumeria graminis*, por la expresión constitutiva de un gen antifúngico de cebada (Bieri *et al*, 2003). En ambos trabajos el promotor utilizado fue el promotor del gen de la ubiquitina de maíz (promotor constitutivo comúnmente utilizado en monocotiledóneas). Sin embargo, poco se ha hecho hasta la fecha con la utilización de promotores inducibles o con expresión específica de tejido en cereales. Recientemente, Altpeler y colaboradores (2005), han demostrado que la expresión en trigo de un gen que codifica una peroxidasa bajo control de un promotor también de trigo específico de epidermis, es efectivo para la protección de la planta frente al hongo *Blumeria graminis*.

En lo que se refiere a arroz, existen algunos trabajos que describen la obtención de plantas resistentes a diferentes patógenos, en todos los casos mediante la utilización de promotores constitutivos. La expresión de dos genes de quitinasa de clase I de arroz (Nishizawa *et al*, 1999), o del gen *Rir1b* (familia WIR1 de genes de cereales relacionados con la defensa) (Schaffrath *et al*, 2000), bajo el control del promotor 35S CaMV, han permitido obtener plantas más resistentes al hongo *M. grisea*. Dos genes de puroindolinas de trigo expresadas en plantas de arroz bajo el control del promotor constitutivo ubiquitina, confirieron resistencia frente a piriculariosis. Asimismo, plantas transgénicas de arroz que expresan constitutivamente el gen de una defensina de la planta wasabi, mostraron resistencia frente a *M. grisea* (Kanzanki *et al*, 2002). La expresión bajo el control del

promotor 35S CaMV de una proteína antimicrobiana de la leche humana, la lactoferrina, confiere resistencia frente a la bacteria *Pseudomonas plantarii* (Takase *et al*, 2005). Sin embargo, no se han obtenido hasta la fecha plantas transgénicas de arroz resistentes a patógenos mediante la expresión inducible de un transgén.

Para conseguir resistencia en plantas transgénicas frente a hongos patógenos, además de utilizarse un promotor adecuado capaz de conferir expresión del transgén en el momento y lugar correcto y con niveles de expresión suficientemente elevados, hace falta utilizar el gen antifúngico más apropiado para frenar el desarrollo de la enfermedad. Tradicionalmente se han utilizado genes de origen vegetal para la obtención de plantas transgénicas. Sin embargo, estas estrategias no han resultado del todo satisfactorias. Por ese motivo, se trabaja intensamente en la identificación de genes antifúngicos que participan en la respuesta de defensa de otros organismos (Lorito y Scala, 1999; Kawata *et al*, 2003). Tal y como se ha comentado en el apartado 5, las proteínas antifúngicas y antibacterianas son componentes clave en los mecanismos de defensa de muchos grupos de hongos y de bacterias, y casi siempre son efectivos frente a un amplio rango de dianas. Frecuentemente, estos genes muestran una actividad antifúngica mucho más fuerte que los genes de origen vegetal (Lorito y Scala, 1999). Un ejemplo típico son las quitinasas. Los genes que codifican quitinasas vegetales han sido utilizados durante mucho tiempo para transformar una gran variedad de plantas, pero hasta la fecha no se ha conseguido obtener ninguna con niveles de resistencia suficientemente elevados o frente al patógeno que se desea combatir. Cuando se utilizan genes de quitinasas de hongos como transgenes se obtienen niveles de resistencia más importantes y frente a un espectro más amplio de patógenos, comparado con lo que se observa cuando se utilizan genes de quitinasas vegetales (Terakawa *et al*, 1997; Lorito *et al*, 1998). Estos resultados no son del todo sorprendentes, ya que las quitinasas de hongos, especialmente de los micoparásitos, han evolucionado y están especializadas en degradar la pared celular de otros hongos del entorno.

El primer ejemplo del empleo de un gen de origen no vegetal para aumentar la resistencia frente a patógenos se describió en 1988 por Jones y colaboradores. En ese trabajo expresaron una quitinasa de la bacteria *Serratia marcescens*, *chiA*, en plantas de tabaco, demostrando que la proteína se acumulaba correctamente en las hojas. En el mismo año, se demostró que plantas de tabaco expresando ese mismo gen presentaban resistencia frente a la infección por *Alternaria longipes* (Suslow *et al*, 1988). Posteriormente se vio que estas plantas también eran resistentes a *Rhizoctonia solani* en ensayos de campo (Howie *et al*, 1994). Como se ha indicado anteriormente, en plantas de arroz también se ha obtenido un aumento en la resistencia frente a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* por la expresión constitutiva, bajo el control del promotor 35S CaMV, del gen de la cecropina B del

Introducción

insecto *Bombyx mori* (Sharma *et al*, 2000). El ejemplo más conocido y que mejor ilustra las ventajas de la utilización de genes de origen no vegetal para la obtención de plantas resistentes, son los genes *Bt*. Así, diferentes genes *Bt*. provenientes de diferentes subespecies de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* se han utilizado para obtener plantas resistentes de variedades comerciales de maíz, arroz, patata o algodón. El uso de genes *Bt*. ilustra las ventajas de la utilización de un gen microbiano para la obtención de plantas transgénicas.

Otra forma alternativa de obtener resistencia en plantas transgénicas empleando genes de origen no vegetal, es a través de la utilización de genes de avirulencia (*avr*) de patógenos capaces de activar las respuestas de defensa de las plantas. En interacciones planta-patógeno que siguen el modelo gen-a-gen (Flor, 1971), la interacción entre el producto del gen de avirulencia del patógeno (*avr*) con el producto del gen de resistencia de la planta (*R*) conduce a la resistencia. En base a este sistema, se han expresado genes *avr* en plantas que poseen el correspondiente gen *R*. En estos casos es fundamental evitar la expresión basal o constitutiva del gen *avr*. En caso contrario, se produciría una respuesta HR generalizada en toda la planta con la consecuente muerte de la misma. El gen *avr* debe expresarse bajo control de un promotor inducible por patógenos, de forma que la respuesta de defensa se active solamente en el momento de la infección. Algunos ejemplos de esta estrategia son la resistencia en tomate por la expresión del gen *Avr9* de *Cladosporium fulvum*, y de *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* (Strittmatter *et al*, 1996; Tobias *et al*, 1999); o en plantas de tabaco por la expresión de los genes *inf1* de *Phytophthora infestans*, y *Avr9* de *C. fulvum* (Kamoun *et al*, 1999). Estos resultados indican que la utilización de genes de avirulencia de los patógenos puede ser empleada para la obtención de resistencia en plantas que poseen el correspondiente gen *R*. Una estrategia similar es la expresión de genes que codifiquen un elicitor bacteriano, capaz de activar las respuestas de defensa de la planta. Siguiendo esta estrategia, se obtuvieron plantas de tabaco resistentes a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* a través de la producción de la proteína elicitora cryptogeína (expresado bajo control de un promotor inducible por patógeno) (Keller *et al*, 1999).

En lo que se refiere al control de las enfermedades causada por el hongo *Botrytis cinerea* a través de la obtención de plantas transgénicas, poco se ha hecho hasta la fecha. Punja y Raharjo (1996) introdujeron el gen de una quitinasa básica de tabaco en plantas de zanahoria y observaron cierta protección frente a la infección por *B. cinerea*. Sin embargo, en el mismo estudio no se pudo observar ninguna protección al introducir este mismo gen en plantas de pepino. Terakawa y colaboradores (1997) obtuvieron plantas de tabaco transgénicas resistentes a los hongos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea*. Para ello expresaron un gen de quitinasa involucrado en la autólisis del hongo filamentoso *Rhizopus oligosporus*, bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV. Tabei y colaboradores

(1998), produjeron plantas de pepino expresando el gen de una endoquitinasa de arroz bajo control del promotor constitutivo 35S CaMV obteniéndose niveles de resistencia frente a *B. cinerea* bastante satisfactorios.

Finalmente, la expresión constitutiva de un inhibidor de poligalacturonidasa de pera en plantas de tomate, ha permitido obtener plantas resistentes al ataque de *B. cinerea*, siendo el primer ejemplo de plantas de tomate transgénicas resistentes a este patógeno (Powel *et al*, 2000). En este estudio se pudo demostrar que aunque se produce el establecimiento inicial de la infección por *B. cinerea*, la expansión de las lesiones se reduce significativamente tanto en los frutos como en las hojas de las plantas transgénicas.

Las proteínas y péptidos antimicrobianos han sido identificados en diferentes organismos, incluyendo plantas, hongos, bacterias, insectos, invertebrados y vertebrados. Los mecanismos de acción de estas proteínas son tan variados como los organismos de los cuales provienen, e incluyen la degradación de polímeros de la pared celular, la formación de poros en las membranas, daños a ribosomas e inhibición de la síntesis de DNA o del ciclo celular. Estas proteínas son efectivas para inhibir el crecimiento de un amplio espectro de hongos, siendo necesarias concentraciones muy bajas para que sean efectivas (nivel micromolar). Los genes que codifican proteínas antimicrobianas representan por lo tanto una herramienta de gran utilidad para generar plantas transgénicas resistentes a la infección por hongos. Sin embargo, el mecanismo por el cual muchos de estos compuestos ejercen su actividad antimicrobiana sigue sin conocerse.

La presente tesis se ha centrado en el estudio de las propiedades antifúngicas y mecanismo de acción de la proteína AFP del hongo del suelo *Aspergillus giganteus*, y en la evaluación de la eficacia del gen *afp* para la protección frente a enfermedades en plantas transgénicas. Los objetivos concretos que se plantearon fueron los siguientes:

I: Determinar si la proteína AFP es efectiva para inhibir el crecimiento de hongo *Botrytis cinerea*, y en particular de aislados de este hongo responsables de la podredumbre gris en plantas de geranio.

II: Obtener de plantas transgénicas de arroz resistentes al hongo *Magnaporthe grisea* mediante una estrategia basada en la expresión inducible del gen *afp* de *Aspergillus giganteus*.

1) Identificar un promotor adecuado para el objetivo propuesto, esto es, un promotor inducible en situaciones de infección por *M. grisea*.

2) Determinar el grado de protección que confiere la expresión inducible del gen *afp* en plantas transgénicas de arroz.

III: Estudiar del mecanismo por el cual la proteína AFP ejerce su actividad antifúngica frente a *Magnaporthe grisea*.

Objetivos

I MATERIAL

1- Material Biológico

1.1 Bacterias

- ***Escherichia coli* DH5 α F`** (Hanahan, 1983), utilizada para las clonaciones.
- ***Agrobacterium tumefaciens* EAH105** (Hood *et al*, 1993), utilizada para la transformación estable de *Oryza sativa*.

1.2 Hongos

- ***Magnaporthe grisea* PR9** (CIRAD Montpellier, Francia)
- ***Botrytis cinerea*** aislados CC1, CC19, CC24 y CC27 (Fundación Promiva, Madrid)

1.3 Plantas

- ***Oryza sativa*** L. var. japonica Senia (arroz)
- ***Pelargonium hortorum*** cv. Eclipse RedII (geranio)

1.4 Plásmidos

- **pGEMTeasy** (Promega), utilizado para clonar productos de PCR.
- **pAHC17** (Christensen & Quail, 1996), cedido por el Dr. Emmanuel Guiderdoni (CIRAD-Montpellier, Francia) formado a partir del esqueleto del plásmido pUC8. Contiene el promotor del gen de la *ubiquitina* 1 de maíz (1 intrón y 1 exón) y el terminador del gen de la nopalina sintasa (*nos*) con una única diana de clonación entre ambos (*Bam*HI).
- **pBSK** (pBluescript). Utilizado para clonaciones.
- **pCAMBIA 1381Z** (CAMBIA, www.cambia.org). Vector para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Kan^R, higromicina^R. Portador del gen reportero β -glucuronidasa (*uid A* o *gus A*) y utilizado para el análisis funcional de promotores.
- **pCAMBIA 1300** (CAMBIA). Vector para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Kan^R, higromicina^R.

2- Medios de cultivo

2.1 Bacterias

Medio LB

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH 7,5 ajustado con NaOH	
Agar (para medio sólido)	15 g/L
Autoclavar 20 minutos	

Material y Métodos

Medio SOB

Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Autoclavar 20 minutos	

Medio YEB

Beef extract	5 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
Peptona	5 g/L
Sacarosa	5 g/L
MgSO ₄	0,48 g/L
Agar (para medio sólido)	15 g/L
Autoclavar 20 minutos	

2.2 Hongos

Medio PDB

Potato dextrose broth (PDB) (Difco)	24 g/L
Agar (para medio sólido)	15 g/L
Autoclavar 40 minutos	
Cloramfenicol	30 mg/L

Medio de arroz

Granos de arroz (var. Senia) triturados	20 g/L
Extracto de levadura	2,5 g/L
Agar (para medio sólido)	15 g/L
Autoclavar 40 minutos	
Cloramfenicol	30 mg/L

2.3 Plantas

Medio Agar+Kinetina

Agar	1 %
Autoclavar 20 minutos	
Kinetina	1 mL/L (de una solución a 2 mg/mL en etanol 50%)

Medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

NH ₄ NO ₃	1650 mg/L
KCl	170 mg/l
KNO ₃	1900 mg/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440 mg/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370 mg/L
MnSO ₄ , 4H ₂ O	6,2 mg/L
H ₃ BO ₃	22,3 mg/L
KI	0,83 mg/L
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25 mg/L
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025 mg/L
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025 mg/L
Ácido nicotínico	0,5 mg/L
Piridoxina HCl	0,5 mg/L
Tiamina HCl	0,1 mg/L
Mio-inositol	100 mg/L
Glicina	2 mg/L

Medio para germinación de arroz *in vitro*

MS (sales y vitaminas, marca Duchefa)	4,4 g/L
sacarosa	10 g/L
pH 5,8 ajustado con NaOH	
agar (marca Difco)	8 g/L
Autoclavar 20 minutos	

Sustrato para cultivo de arroz

Se hace una mezcla de turba rubia de sphagnum pH 3,5 (materia orgánica = 96%; nitrógeno total = 1%; marca Torfcosa Plantaflor) y de vermiculita a 1:1. Por cada kilo se añade 1 gramo de CaCO₃ y 1 gramo de abono 15-15-15*. Esta mezcla se humedece y se deja reposar 1 semana. Después de ese tiempo se puede usar. No se debe autoclavar.

* Nitrógeno total (nitrato, amoniacal y ureico), 15%

Anhídrido fosfórico (P₂O₅), 15%

Oxido de potasio (K₂O), 15%

Solución nutritiva para fertirrigación de arroz

KNO ₃	8,4 mM
NH ₄ NO ₃	1,2 mM

Material y Métodos

K ₂ HPO ₄	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	3,6 mM
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	2,5 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,7 mM
SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,6 mM
Kelamix (quelato de hierro: Fe-EDDHA)	35 mg/L
microelementos*	0,4 g/L
* B	0,005%
Cu	0,001%
Fe	0,012%
Zn	0,004%
Mo	0,005%
Mn	0,005%
Quelados por EDTA	

3- Tampones y soluciones

TE

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	5 mM

Guardar a temperatura ambiente

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato trisódico	0,3 M

Guardar a temperatura ambiente pH=7,0

SSPE 20X

NaCl	3,6 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
EDTA	20 mM

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente pH=7,4

TBE 10X

Tris-HCl	0,089 M
Ácido bórico	0,089 M
EDTA	0,002 M

Guardar a temperatura ambiente

MEN 10X

MOPS	200 mM
Acetato sódico	50 mM
EDTA	10 mM
Guardar a 4°C. pH=7,0	

Denhardt 's 100X

Ficoll	20 g/L
Polivinilpirrolidona (PVP)	20 g/L
BSA	20 g/L
Guardar a -20°C	

Solución desnaturalizante

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M
Guardar a temperatura ambiente	

Solución neutralizante

Tris-HCl	0,5 M
NaCl	1,5 M
pH 8,0 ajustado con HCl 25 %	
Guardar a temperatura ambiente	

Tampón de carga para DNA 6X

Glicerol	30 %
Azul de bromofenol	0,25 %
Xileno cianol FF	0,25 %
EDTA	0,5 M pH 8,0
Guardar a -20°C	

Tampón de carga para RNA 2X

Tampón de carga para DNA 6X	20 %
Formamida desionizada	50 %
Formaldehído	6,4 %
MEN 10X	10 %
Bromuro de etidio	200 µg
Guardar a -80°C	

Material y Métodos

RNAasa

Tris-HCl	10 mM
NaCl	15 mM
Ribonucleasa A	10 mg/mL

Calentar a 65°C durante 15 minutos antes de guardar a -20°C

II MÉTODOS

Las técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos se han realizado siguiendo los manuales *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook *et al*, 1989), y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al*, 1998). Los métodos que se describen a continuación corresponden a técnicas puestas a punto en el transcurso de este trabajo, o bien que han sido fundamentales para la obtención de los resultados presentados.

1- Relacionados con bacterias y ácidos nucleicos

1.1 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

- se inocula en 5 mL de medio LB una colonia de *E. coli* de la cepa DH5 α
- se incuba durante \pm 16h a 37°C con una agitación orbital constante de 250 rpm
- se pasan 2,5mL de este cultivo a otro erlenmeyer (de 1 L) con 250 mL de medio LB
- se incuba en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcance una D.O. de 0,5 a 600 nm
- se enfria el cultivo en hielo durante 15 minutos
- se transfiere el cultivo a tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo
- se centrifuga durante 10 minutos a 4°C y a 4000 rpm (anular el freno de la centrifuga para que la parada no sea brusca)
- se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado, por pipeteado suave, en 50 mL de solución TFB1, previamente enfriada a 4°C
- se transfiere a otro tubo de centrifuga y se incuba 10 minutos en hielo
- se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 4°C y a 4000 rpm
- se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células por pipeteado suave en 5 mL de solución TFB2, previamente enfriada a 4°C
- se hacen alícuotas de 100 μ L de células en tubos *ependorf* y se congela inmediatamente en N₂ líquido
- se guardan las células a -80°C

Solución TFB1*

KOAc	30 mM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	50 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM

RbCl	100 mM
glicerol	15%

Solución TFB2*

MOPS pH 7,0 con NaOH	10 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	75 mM
RbCl	10 mM
glicerol	15%

* esterilizar por filtración

1.2 Transformación de células competentes de *E. coli*

- se añade 1 µg de DNA plasmídico o la reacción de ligación de DNA a una alícuota de 100 µL células competentes
- se congela inmediatamente en N₂ líquido
- se incuba el tubo en baño-maría a 37°C durante 5 minutos
- se añade 1 mL de medio SOB y se incuba en agitación durante 1 hora a 37°C
- se centrifuga durante 60 segundos a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 µL de medio SOB
- se siembran las células en placa de Petri con medio LB sólido con los antibióticos adecuados para la selección de la cepa bacteriana y de los plásmidos utilizados

1.3 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* a gran escala

Para la obtención de DNA plasmídico de *E. coli* a gran escala se utilizó el kit para midipreparaciones de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiendo de un cultivo bacteriano de 200 mL, el rendimiento fue de 200-300 µg de DNA plasmídico (para plásmidos derivados del vector pBSK).

1.4 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala ("mini prep")

- se inocula en 4 mL de medio LB una colonia de bacteria y se incuba durante ± 16h a 37°C con agitación orbital constante de 250 rpm
- se centrifugan 1,5 mL del cultivo, 2 minutos a 13000 rpm
- se descarta el sobrenadante y se repite el paso anterior
- se resuspende en 200 µL de solución I
- se añaden 200 µL de solución II y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos (el líquido se pone transparente)
- se añaden 200 µL de solución III y se mezcla (el líquido se pone viscoso)
- se centrifuga durante 10 minutos a 13000 rpm

Material y Métodos

- se pasa el sobrenadante a otro tubo
- se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm
- se pasa el sobrenadante a otro tubo
- se añade 0,7% del volumen de isopropanol y se centrifuga durante 10 minutos a 13000 rpm
- se descarta el sobrenadante
- se añaden 300 μ L de etanol 70% para lavar el precipitado
- se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm
- se descarta el sobrenadante y se seca el precipitado a temperatura ambiente
- se resuspende en 40 μ L de agua MilliQ autoclavada
- se añaden 2 μ L de RNAsa (10 mg/mL) y se incuba a 37°C durante 15 minutos
- se guarda a -20°C

Solución I:

glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM

Ajustar el pH a 8,0 con HCl. Autoclavar 15 minutos y mantener a 4°C.

Solución II:

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Guardar a temperatura ambiente

Solución III:

Acetato potásico	3 M
Ácido acético glacial	5 M

No autoclavar y mantener a 4°C.

1.5 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

- se inocula a partir de colonia o glicerinado la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que será utilizada, en 5 mL de medio YEB y se incuba durante \pm 16h a 28°C con una agitación orbital constante de 250 rpm
- se pasa 2 mL del cultivo anterior a un erlenmeyer con 50 mL de medio YEB y se incuba a 28°C con una agitación orbital constante de 250 rpm hasta que la D.O. a 600 nm sea de 0,5-1,0
- se enfria el cultivo en hielo

- se centrifuga durante 5 minutos a 4500 rpm y a 4 °C
- se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 mL de CaCl₂ 20 mM enfriado en hielo.
- se preparan alícuotas de 100 µL de células competentes y se guardan a -80 °C

1.6 Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*

- se añade 1 µg de DNA plasmídico a una alícuota de células competentes
- se congela inmediatamente en N₂ líquido
- se incuba en baño-maría a 37 °C durante 5 minutos
- se añade 1mL de medio YEB y se incuba en agitación durante 2-4 horas a 28 °C
- se centrifuga durante 30 segundos a 11000 rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 µL de medio YEB
- se siembran las células en placa de Petri con medio YEB sólido y los antibióticos adecuados para la selección de la cepa bacteriana y de los plásmidos utilizados

1.7 Extracción de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* a pequeña escala

- se inocula en 4 mL de medio YEB una colonia de bacteria y se incuba durante ± 16h a 28°C con una agitación orbital constante de 250 rpm
- se centrifugan 1,5 mL del cultivo durante 1 minuto a 13000 rpm
- se descarta el sobrenadante y se repite el paso anterior
- se añade 1mL de tampón STE y se agita vigorosamente
- se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm
- se descarta el sobrenadante y se sigue como en la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* a partir de la solución I (apartado 1.4)

Tampón STE:

NaCl	150 mM
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Nota: Se recomienda hacer una extracción con fenol/cloroformo (Sambrook *et al*, 1989) una vez finalizado el protocolo.

1.8 Extracción de DNA genómico de *Oryza sativa* y *Magnaporthe grisea*

Este método permite la extracción rápida de grandes cantidades de DNA genómico. Se ha de tener en cuenta que todos los pasos se deben realizar suavemente y que el DNA genómico se debe guardar a 4°C (y no a -20°C) para evitar su fragmentación.

Material y Métodos

- se tritura aproximadamente 1 gramo de material congelado en N₂ líquido y pasarlo a un tubo de polipropileno de 15 mL
- se añaden 5 mL de tampón de extracción MATAB precalentado a 74°C
- se agita vigorosamente
- se incuba en baño-maría a 74°C de 20 minutos a 1 hora, agitando de vez en cuando
- se enfria a temperatura ambiente, se añaden 6 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 VV) y se mezcla las 2 fases suavemente
- se centrifuga durante 20 minutos a 4000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio
- se añaden 15 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incuba a 37°C durante 30 minutos
- se añaden 6 mL más de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 VV) y se mezclan las 2 fases suavemente
- se centrifuga durante 20 minutos a 4000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio, de 50 mL
- se añaden 5 mL de isopropanol a temperatura ambiente y se invierte el tubo suavemente para precipitar el DNA, que se visualiza en forma de un agregado algodonoso de color blanco.
- con la ayuda de una pipeta Pasteur se transfiere el DNA a un tubo *ependorf* con 300 µL de agua autoclavada para que se resuspenda, y se guarda a 4°C
- se comprueba la calidad del DNA en un gel de agarosa. Se cuantifica mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (1 OD_{260nm}=50 µg de DNA). La pureza del DNA se puede estimar mediante el cálculo de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm. El valor considerado ideal está entre OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1,8 - 2,0.

Tampón de extracción MATAB

Tris-HCL pH 8,0	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
MATAB*	2%
PEG 6000	1%
Sulfito sódico	0,5%

* *Mixed alkyltrimethylammonium bromide* (Sigma)

1.9 Extracción de RNA total de *Oryza sativa*

La extracción de RNA es un proceso delicado que requiere mucho cuidado para evitar su degradación. Todo el material utilizado debe ser cuidadosamente lavado con detergente y aclarado con agua MilliQ autoclavada libre de RNAsas.

Material y Métodos

- se tritura el tejido vegetal congelado en N₂ líquido y se llenan aproximadamente 2/3 partes de un tubo *ependorf*
- se añaden 200 µL de tampón Z6 a temperatura ambiente y 20 µL de β-mercaptoetanol
- se mezcla vigorosamente en un vórtex
- se añaden 200 µL más de tampón Z6 y se vuelve a mezclar
- se añaden 400 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 VVV) y se agita vigorosamente
- se centrifuga durante 30-45 minutos a 13000 rpm preferentemente a 4°C
- se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo
- se añade 1/10 del volumen de ácido acético 1 M y 1 volumen de etanol absoluto, en este orden
- se mezcla vigorosamente y se precipita el RNA (20 minutos a -80°C o toda la noche a -20°C)
- se centrifuga durante 10 minutos a 13000 rpm y se descarta el sobrenadante
- se lava el precipitado con 300 µL de etanol 70% frío, centrifugando 5 minutos a 13000 rpm
- se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado, como indicado arriba, con 200 µL de acetato sódico 3 M para eliminar los polisacáridos
- se repite el lavado con etanol 70% 2 veces más
- se descarta el sobrenadante y se seca el precipitado a temperatura ambiente
- se resuspende en 50 µL de agua autoclavada
- se agita durante 15-20 minutos
- se calienta a 65°C durante 5 minutos
- se centrifuga 2 minutos a 13000 rpm y se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo
- se guarda el RNA a -80°C
- se comprueba la calidad del RNA en un gel de desnaturizante de formaldehído (ver apartado 1.13.1). Se cuantifica mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm ($1OD_{260nm}=40\mu g$ de RNA). La pureza del RNA se puede estimar mediante el cálculo de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm. El valor considerado ideal está entre $OD_{260}/OD_{280} = 1,8 - 2,0$.

Tampón Z6

Guanidin-HCl	8 M
MES pH 7,0 *	20 mM
EDTA	20 mM

* ajustar el pH con KOH 10 N

Material y Métodos

1.10 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se hizo visualmente en geles de agarosa por comparación con patrones de DNA de concentraciones conocidas.

1.11 Reacciones de modificación de DNA: digestión, defosforilación y ligación

En este trabajo se realizaron reacciones de digestión de DNA con endonucleasas de restricción, defosforilaciones y ligaciones, siempre siguiendo los protocolos descritos por Ausubel *et al.* (1998) y Sambrook *et al.* (1989), y teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes para cada uno de los enzimas utilizados.

1.12 Transferencia de DNA (*Southern Blot*) e hibridación con sondas radioactivas

1.12.1 Transferencia de DNA a membrana de nylon

- se separan electroforéticamente las muestras de DNA por analizar en un gel de agarosa 0,8% preparado con tampón TBE 1X, 10 µg de DNA genómico digerido con los enzimas adecuados, con un voltaje constante de 70 voltios durante aproximadamente 7 horas
- antes de empezar el tratamiento del gel para la transferencia, se hace una foto con una regla al lado del marcador de peso molecular para posteriormente inferir el tamaño de los fragmentos hibridados
- se realiza un tratamiento del gel (siempre con agitación suave):
 - 20 minutos en HCl 25N
 - 30 minutos en solución desnaturizante
 - 15 minutos en solución neutralizante
 - se lava con agua autoclavada
- se monta el sistema de transferencia siguiendo este orden:
 - en una bandeja de vidrio se pone solución de SSC 10X
 - sobre la bandeja se pone una placa de vidrio y sobre ésta un trozo de papel 3MM de manera que esté en contacto con el SSC de la bandeja por los 2 lados ("puente")
 - sobre este "puente" completamente empapado de SSC 10X se pone el gel
 - sobre el gel, se pone en el siguiente orden:
 - membrana de nylon *Hybond-N* (Amersham) previamente mojada en agua (no se puede secar), con cuidado para que no queden burbujas de aire entre el gel y la membrana
 - 5 hojas de papel 3MM *
 - una pila de aproximadamente 10 cm de papel de filtro *
 - una placa de vidrio

- un peso de aproximadamente 250 gramos
- * los papeles sobre el gel no deben tocar el "puente"
- se deja la transferencia por aproximadamente 18 horas
- se retiran todos los papeles, y con un lápiz se marca sobre la membrana, antes de retirarla del gel, los pocillos y la orientación en que estaba puesta
- se fija la membrana durante 5 minutos con luz ultravioleta, y después por 2 horas a 80°C
- después de fijado el DNA en la membrana, ésta se puede guardar a temperatura ambiente hasta su utilización

1.12.2 Marcaje y purificación de sondas radioactivas

Para el marcaje radioactivo del fragmento a ser utilizado como sonda, se utilizó el *Random Primed DNA Labeling Kit* (ROCHE), que se basa en la utilización de oligonucleótidos de 100-200 pb de secuencias aleatorias, y del enzima Klenow DNA polimerasa.

- a 2 µL del DNA sonda (entre 50 y 100 ng) se añaden 10 µL de agua, se desnaturaliza a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente después se pone en hielo
- se añade 1 µL de cada nucleótido no marcado, 2 µL del nucleótido marcado radioactivamente (α -³²P dCTP en este trabajo), 2 µL de la mezcla de oligonucleótidos y 1 µL del enzima Klenow
- se incuba durante 1 hora a 37°C y se procede a la purificación de la sonda

La purificación se realiza para eliminar los oligonucleótidos radioactivos no incorporados a los fragmentos sintetizados en la reacción de marcaje. Para la purificación se utilizaron las columnas *Probe Quant™ G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.12.3 Hibridación

- Prehibridación:

- se coloca la membrana en el tubo de hibridación con 20 mL de solución de prehibridación
- se prehibrida durante al menos 5 horas a 65°C con constante rotación del tubo

- Hibridación:

- se desnaturaliza la sonda previamente marcada con radioactividad durante 10 minutos a 100°C
- se añade la sonda a 10 mL de solución de hibridación y se sustituye la solución de prehibridación
- se hibrida durante ±16 horas a 65°C y con rotación constante

- Lavados:

Material y Métodos

Los lavados se hacen para eliminar interacciones inespecíficas en la membrana. Todos se hacen a 65°C con rotación constante.

- 1 lavado de 10 minutos en la solución 1
 - 2 lavados de 30 minutos en la solución 2
 - 2 lavados de 30 minutos en la solución 3
- *Exposición:*

Después de los lavados de la membrana, se coloca dentro de un plástico sellado, y se expone dentro de un casete con un film de autoradiografía (Kodak X-OMAT AR Film, XAR-5) a -80°C durante el tiempo necesario.

Solución de prehibridación e hibridación*

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
SSC	5 X
SDS	0,2 %
sol. Denhardt´s	1 X
DNA de esperma de salmón desnaturalizado	0,1 mg/mL

* para la solución de hibridación se añade 10 % de sulfato de dextrano y la sonda marcada radioactivamente previamente desnaturalizada por 10 minutos a 100°C

Soluciones de lavado

Solución 1	
SSC	2 X
SDS	0,5 %
Solución 2	
SSC	0,5 X
SDS	0,1 %
Solución 3	
SSC	0,1 X
SDS	0,1 %

1.13 Transferencia de RNA (Northern Blot) e hibridación con sondas radioactivas

1.13.1 Electroforesis en gel desnaturalizante de RNA

Después de la extracción del RNA total del tejido de interés, en este caso hojas de arroz, se procede a su cuantificación por espectrofotometría.

Una vez cuantificadas, las muestras se preparan para cargar en el gel de la siguiente manera:

- se añade a cada muestra, llevadas al mismo volumen con agua autoclavada, el mismo volumen de tampón de carga para RNA 2X y se desnaturalizan por 5 minutos a 65°C.
- se cargan las muestras en un gel desnaturalizante de formaldehído y se aplica un voltaje constante de 80 voltios durante aproximadamente 4 horas
- una vez terminada la electroforesis, se lava el gel con agua MilliQ autoclavada antes de transferir a la membrana de nylon.

Gel desnaturalizante de formaldehído

MOPS	1 X
Agarosa	1,5 g/100mL

Se calienta en el microondas hasta que la agarosa quede bien disuelta. Se enfría hasta 60°C y se añade el formaldehído, hasta que esté a una concentración final de 6,3%

1.13.2 Transferencia de RNA a membrana de nylon

La transferencia de RNA a la membrana de nylon y la posterior fijación se hacen exactamente como descrito anteriormente para la transferencia de DNA (*Southern Blot*) (apartado 1.12.1).

1.13.3 Marcaje y purificación de sondas radioactivas

El marcaje y la purificación de la sonda radioactiva se hacen exactamente como descrito para el *Southern blot* (apartado 1.12.2).

1.13.4 Hibridación

- Prehibridación:

- se introduce la membrana en el tubo de hibridación con 20 mL de solución de prehibridación
- se prehibrida durante al menos 5 horas a 42°C con constante rotación del tubo

- Hibridación:

- se desnaturaliza la sonda previamente marcada durante 10 minutos a 100°C
- se añade la sonda a 10 mL de solución de hibridación y se sustituye la solución de prehibridación
- se hibrida durante ± 16 horas a 42°C y con rotación constante

- Lavados:

Los lavados se hacen con rotación constante, inicialmente a 42°C y posteriormente a 65°C. En general se hacen 3 lavados de 30 minutos a 42°C y 1 lavado a 65°C también de 30 minutos.

Material y Métodos

- Exposición:

Después de los lavados de la membrana, se coloca dentro de un plástico sellado, y se expone dentro de un casete con un film de autoradiografía (Kodak X-OMAT AR Film, XAR-5) a -80°C durante el tiempo necesario.

Solución de prehibridación e hibridación*

Formamida	40%
SSPE	5 X
SDS	0,5%
Denhardt´s	5 X
DNA de esperma de salmón	0,1 mg/mL

* para la solución de hibridación se añade la sonda marcada radioactivamente previamente desnaturalizada por 10 minutos a 100°C

Solución de lavado

SSC	3 X
SDS	0,5%

2 Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (*gusA*)

El enzima β -glucuronidasa, o GUS, codificado por el gen *uidA*, hidroliza el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucuronido (X-GLUC) en un compuesto que forma cristales azules, el diXH-indigo. A través de la observación de esta coloración azul podemos decir si este gen se está expresando en un determinado tejido o en una determinada condición, y de esta manera estudiar la actividad de un promotor concreto. Se siguió el protocolo descrito por Jefferson *et al* (1987). Se analizaron muestras de tejido vegetal en diferentes condiciones que se enumeran a continuación, siempre en plantas en un estadio de 2 hojas.

Tallo:

- se cortan fragmentos de tallo de aproximadamente 1,5 cm de longitud y se procesan (ver apartado 2.1).

Raíz:

- a) se seccionan fragmentos de raíz y se procesan (T=0h)
- b) en otra raíz de la planta se realizan cortes longitudinales con un bisturí y se dejan sobre papel embebido en agua durante 2h antes del procesamiento (T=2h)

Semillas:

- a) se decortican manualmente las semillas y se procesan

b) se decortican manualmente las semillas, se hace un corte longitudinal con un bisturí y se procesan

c) se decortican las semillas con la utilización de papel abrasivo y se procesan

Hojas:

a) control: se seccionan fragmentos de cerca de 1cm de longitud de la segunda hoja de plantas sin tratar, eliminando siempre la extremidad.

b) tratadas con esporas o elicitores de *M. grisea*:

- se corta la segunda hoja de una planta cultivada en invernadero y se coloca en posición invertida con la cutícula en la parte inferior (abaxial) con la ayuda de pinzas en una placa con medio agar+kinetina, con cuidado para no dañar la hoja

- con pinzas se colocan sobre cada hoja de 4 a 6 discos de papel de filtro embebidos en la solución de interés (esporas o elicitores de *M. grisea* a la concentración deseada). La preparación de los elicitores se realiza tal y como se describe en el apartado 4.8.

- se sellan las placas con parafilm™, se ponen en bandejas de plástico con el fondo cubierto con papel de filtro humedecido. Se envuelve toda la bandeja con plástico transparente para que se forme una cámara húmeda. Esta bandeja ahora se mantiene en oscuridad a 28°C durante 48h

- después de este periodo, se abre la cámara húmeda, las placas, y se retiran los discos con la ayuda de pinzas. Se continua el tratamiento ahora en condiciones de fotoperiodo controlado (12h luz/12h oscuridad), a 28°C durante el período de tiempo necesario.

c) heridas

- se corta un fragmento de hoja de aproximadamente 1,5 cm y se procesa (control)

- con un bisturí se hacen cortes transversales al eje de la hoja en un fragmento de aproximadamente 1,5 cm y se procesa (T=0h)

- se repite el procedimiento anterior, pero el procesamiento de la muestra se hace 6h después de haber hecho los cortes (T=6h)

d) cinética de inducción por herida

- se corta un fragmento de hoja de aproximadamente 1,5 cm y se procesa (control)

- con un bisturí se hacen cortes transversales al eje de la hoja en un fragmento de aproximadamente 1,5 cm y se procesa (T=0h)

- se hacen cortes transversales con un bisturí a lo largo de toda la lámina foliar, se recogen muestras de cerca de 1,5 cm a diferentes tiempos, y se procesan

Material y Métodos

2.1 Protocolo de procesamiento del material vegetal para detección de la actividad de la β -glucuronidasa

- se sumerge la muestra en solución X-GLUC
- se aplica vacío durante 20 minutos para que el sustrato pueda penetrar en el tejido
- se incuba la muestra a 37°C en oscuridad durante aproximadamente 18h
- después de ese tiempo, se sustituye la solución X-GLUC por etanol 70%
- el material se conserva así a 4°C

Solución X-GLUC (para 10 mL)

tampón P	8 mL
metanol 100%	2 mL
X-GLUC*	1 μ M
* 10 mg X-GLUC en 100 μ L de DMSO	

Tampón P* (para 10mL):

NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (100mM)	1 mL
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O (100mM)	4 mL
H ₂ O	5 mL
*concentración final de 50 μ M y pH 7,0	

3- Obtención de la proteína AFP de *Aspergillus giganteus*

La proteína AFP utilizada en este trabajo nos fue cedida por el Dr. Álvaro Martínez del Pozo, de la Universidad Complutense de Madrid. Para su expresión y purificación se utilizó el protocolo descrito por Lacadena y colaboradores (1995). En líneas generales, se cultiva el hongo en erlenmeyers de 1L conteniendo 250 mL de un medio compuesto de 2% de almidón de maíz, 1,5% de beef extract, 2% de peptona y 0,5% de NaCl. El cultivo se incuba con agitación y a 30°C durante 90-100 horas. La purificación se hace en una columna de Sephadex G25 (1,5 x 34,0 cm) equilibrada con 0,1M de ácido acético. La comprobación de la purificación se hace por gel SDS-PAGE, análisis de aminoácidos, y HPLC.

4- Estudios con hongos

4.1 Obtención de esporas de los hongos *Magnaporthe grisea* y *Botrytis cinerea*

- todo el procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar
- se crece el hongo en una placa de Petri con el medio adecuado (medio de arroz para *M. grisea* y PDB para *B. cinerea*). En el caso de *B. cinerea*, se hace inoculando un trozo de micelio proveniente de una placa previamente cultivada. Para *M. grisea*, se parte de un

pequeño trozo de papel de filtro en el que se ha crecido previamente el hongo. Para la preparación de éste, se hace crecer el hongo en un papel de filtro puesto sobre una placa con medio de arroz. Una vez el micelio ha ocupado todo el filtro, se retira del medio y se pone a secar dentro de una placa de Petri vacía a 37°C durante 7 días. Cuando el filtro está seco, se corta en trocitos pequeños con unas tijeras previamente esterilizadas y se guarda a -20°C.

- se incuban las placas con los inóculos a 28°C y un fotoperiodo de 12h de luz/12h de oscuridad durante 2 semanas. Es importante no sobrepasar este tiempo, principalmente en el caso de *M. grisea*, ya que esto influye negativamente en la viabilidad de las esporas.
- una vez el micelio ha crecido, se añaden 5 mL de agua estéril a la placa y se pasa suavemente un asa de vidrio previamente esterilizada para desprender las esporas del micelio.
- se recoge la suspensión de esporas con una pipeta y se filtra a través de *Miracloth* (Calbiochem)
- se cuentan las esporas con una cámara *Burker* y se procede a su utilización. Para los ensayos *in vitro* las esporas se pueden guardar previamente a 4°C, pero para los ensayos *in vivo* es aconsejable utilizarlas el mismo día (las esporas son más infectivas).

4.2 Determinación de la actividad antifúngica de la proteína AFP *in vitro*

Para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de la proteína AFP frente al hongo fitopatógeno *B. cinerea*, se siguió el protocolo descrito por Cavallarín *et al*, 1998. El ensayo se basa en determinar el crecimiento del hongo en cultivos líquidos midiendo periódicamente la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

- en una placa de microtitulación de 96 pocillos, se ponen 150 µL de medio PDB líquido con 0,03 µg/µL de cloramfenicol (para impedir el crecimiento de bacterias) y 50 µL de esporas a una concentración de 10⁶ esporas/mL. Se hacen controles en los que se añade 50 µL de agua, 20µL de nistatina (0,1 µg/µL) (agente antifúngico), ó 50µM de BSA.
- se pregerminan las esporas incubando la placa durante 6h a 28°C, y después de este periodo se añade la proteína AFP a las concentraciones deseadas (siempre en un volumen máximo de 2µL). Se hacen lecturas de la D.O. a 595 nm a diferentes tiempos después de añadir la proteína (16, 20, 24 y 40 horas).
- en cada ensayo se realizan 3 réplicas de cada concentración de proteína.

4.3 Tinción con azul de lactofenol

4.3.1 En ensayos " in vitro "

- se añade una gota de azul de lactofenol a los pocillos de la placa de microtitulación y se incuba a temperatura ambiente durante 4h

Material y Métodos

- se lava con agua antes de la observación al microscopio óptico

4.3.2 En ensayos "in vivo"

- se incuba el trozo de hoja previamente infectado con el hongo en una solución fijadora (etanol 80%; formaldehído 3,5%; ácido acético 5%) y se somete al vacío durante 1h
- se retira la solución fijadora y se sustituye por otra nueva
- se incuba aproximadamente 18h a temperatura ambiente
- se lava con etanol 70% 2 veces durante 5 minutos
- se añade azul de lactofenol hasta que cubra la muestra y se incuba 6h a temperatura ambiente
- se lava con agua antes de la observación al microscopio óptico

4.4 Determinación de la actividad antifúngica de la proteína AFP frente a *Botrytis cinerea* in vivo

Para la determinación de la actividad antifúngica de la proteína AFP frente a *Botrytis cinerea* in vivo se realizó un ensayo utilizando plantas de geranio de la variedad Eclipse RedII.

Se inoculan localmente hojas de geranio (en la superficie adaxial) con 20 μ L de una suspensión de esporas de *B. cinerea* a una concentración de 10⁶ esporas/mL y con 0,25% de detergente tween 20. Enseguida se inocula en el mismo punto 20 μ L de una solución de proteína AFP a la concentración deseada. En los controles positivos se inocula agua en lugar de AFP. Las plantas se mantienen bajo condiciones de alta humedad y los síntomas de las infecciones se siguen visualmente.

En otro ensayo, se inoculó la proteína AFP 3 o 14 días antes de inocular las esporas de *B. cinerea*, tal y como se ha descrito anteriormente.

4.5 Ensayo de inhibición de la germinación de esporas.

Este ensayo se hizo para observar el efecto de la proteína AFP en la germinación de las esporas del hongo *B. cinerea*.

Sobre el lado cóncavo de un vidrio de reloj fijado dentro de una placa de Petri, se colocan 30 μ L de esporas a una concentración de 10⁶ esporas/mL y diferentes concentraciones de proteína AFP, en un volumen final de 500 μ L de medio PDB líquido. En los controles positivos en lugar de AFP se añade agua. Las placas se cierran con parafilm y se incuban a 28°C durante 6h antes de la visualización de las esporas al microscopio óptico.

4.6 Ensayo de determinación de actividad fungistática o fungicida de AFP

Las proteínas antifúngicas pueden actuar de manera fungistática, esto es, inhibiendo el crecimiento del hongo solamente en el periodo en que está en presencia de la proteína (una vez retirada del medio de cultivo el hongo puede seguir creciendo), o fungicida, esto es, matando el hongo (aunque se retire la proteína del medio el hongo no crece).

Para determinar si la proteína AFP actúa de manera fungistática o fungicida frente al hongo *B. cinerea* se hicieron ensayos en los que se crece el hongo en presencia de proteína AFP por diferentes periodos de tiempo, y después ésta fue eliminada del medio de cultivo mediante lavados sucesivos.

Se incuban en una placa de microtitulación 50 μL de esporas (10^6 esporas/mL) en 150 μL de medio PDB líquido y se hace 2 ensayos: uno con esporas pre germinadas durante 6h a 28°C, y otro con esporas sin pregerminar. Después se añade la proteína AFP a diferentes concentraciones. Como controles se utilizan la proteína BSA (10 μM) y nistatina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las placas se incuban a 28°C por diferentes periodos de tiempo, y se lavan los cultivos 2 veces con 200 μL de medio PDB (centrifugando durante 3 minutos a 11.000 rpm). Después de los lavados, las esporas se resuspenden en 50 μL de medio PDB y se inoculan en el centro de una placa de Petri con medio PDB. El crecimiento del hongo se sigue visualmente.

4.7 Ensayo con los colorantes sytox green y congo red en cultivos de hongos

Para realizar este ensayo, se pregerminan las esporas (50 μL , 10^6 esporas/mL en 150 μL de PDA) en placas de microtitulación durante 6h a 28°C. Después de este periodo, se añade la proteína AFP a la concentración deseada y se incuba durante 21h a 28°C. Como controles se utilizan la proteína BSA (10 μM), y nistatina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). También se realiza un control en PDA.

Después de este periodo de incubación se añaden 8 μL de sytox green (5 μM , concentración final de 0,2 μM), o 2 μL de congo red (70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, concentración final de 1mM). Los cultivos se mantienen durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave antes de la observación al microscopio confocal (Leica TCS SP, Heidelberg, Alemania). Las longitudes de onda utilizadas son de 488 nm de excitación y 500-554 nm de emisión para el sytox green, y de 543 nm de excitación y 560-635 nm de emisión para el congo red.

4.8 Obtención de elicitores de hongos

A partir de un trozo de micelio del hongo crecido en una placa de Petri, se inoculan 500 mL de medio líquido (medio de arroz o PDB según el hongo en un erlenmeyer de 2 L). Se mantiene a temperatura ambiente 1 mes hasta que el micelio del hongo cubre toda la superficie del medio. Una vez pasado este tiempo, se filtra el micelio en papel de filtro

Material y Métodos

Whatmann 1MM, se transfiere a un tubo de polipropileno de 50 mL y se congela a -20°C. Se añaden 10 mL de agua y se sonica durante 20 minutos a 100W. Se autoclava durante 40 minutos y se congela a -80°C. Se liofiliza y se resuspende en agua para obtener una suspensión final de 1mg/mL.

4.9 Marcaje de AFP con el fluorocromo Alexa 568

Se ha utilizado el fluorocromo comercial Alexa 568 (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se disuelven 0,5 mg de proteína AFP en 165 µL de bicarbonato sódico 100mM, pH: 8,3. A esta solución se le añaden 5 µL de Alexa-568 previamente disueltos en DMSO (10 mg/mL). La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 horas en oscuridad. Después de este tiempo la proteína se guarda a 4°C hasta su utilización. El tratamiento de los cultivos de hongos con la proteína AFP marcada con Alexa 568 se realiza siguiendo el mismo procedimiento que con la proteína AFP no marcada (ver apartado 4.2). La observación se realiza en un microscopio confocal (Leica TCS SP, Heidelberg, Alemania), con longitudes de onda de 577 nm de excitación y 603 nm de emisión.

4.10 Ensayos de unión de la proteína AFP a ácidos nucleicos

Los ensayos de unión a DNA con la proteína AFP se hicieron utilizando DNA extraído de *M. grisea* siguiendo el protocolo indicado en el apartado 1.8. Los experimentos se realizaron mezclando una cantidad fija de DNA con cantidades crecientes de AFP, en un volumen final de 20 µL de tampón TAE 1X. Las mezclas se mantienen 10 minutos a temperatura ambiente, y se analizan en un gel de agarosa al 0,8%, preparado con tampón TAE 1X.

Tampón TAE 1X:

Tris-acetato, pH 7,0	40mM
EDTA	1mM

Los ensayos de unión a tRNA con la proteína AFP se hicieron utilizando tRNA de levadura comercial (Roche). Los experimentos se realizaron mezclando una cantidad fija de tRNA con cantidades crecientes de AFP, en un volumen final de 20 µL de tampón TAE 1X. Las mezclas se incuban 10 minutos a temperatura ambiente, durante 15 minutos a 65°C, y se analizan en un gel de formaldehído.

4.11 Actividad ribonucleásica de la α -sarcina frente a reticulocitos de conejo

Los reticulocitos de conejo utilizados fueron el "rabbit reticulocyte lysate, untreated" (Promega, ref.: L-4151). En este trabajo se analizó la posible actividad ribonucleásica de

tipo RIP de la proteína AFP. Como control positivo se utilizó α -sarcina comercial (Sigma, ref. S-6907), proteína que también es producida por el hongo del suelo *Aspergillus giganteus*, y que tiene conocida actividad ribonucleásica de tipo RIP sobre el RNA de reticulocitos de conejo. El tampón utilizado en el ensayo fue el siguiente:

KCl	40 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl (pH: 7,5)	40 mM

Para estos ensayos se utilizó el siguiente protocolo:

- a 20 μ L de reticulocitos de conejo se le añaden 50 μ L de tampón final
- se incuba con las proteínas AFP o α -sarcina (1 μ g) durante 30 minutos a 30°C. Como control se utilizan reticulocitos no tratados
- se añade 130 μ L de tampón de parada y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos
- se añaden 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se centrifuga a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C
- se precipita la fase acuosa con 1/10 del volumen de AcNa 3M y 2 volúmenes de etanol 100%
- después de secar, se resuspende el precipitado en 20 μ L de solución de anilina
- incubar los tubos durante 30 minutos en hielo, y hacer otra precipitación con AcNa y etanol
- después de secar el precipitado resuspender en 10 μ L de agua
- se añaden 10 μ L de tampón de carga para RNA y se incuba durante 15 minutos a 65°C antes de cargar las muestras en un gel de agarosa desnaturalizante (ver apartado 1.13.1).

Tampón final

KCl	40 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl (pH: 7,5)	40 mM

Tampón de parada

SDS	0,5%
Tris-HCl (pH: 7,5)	50 mM

Solución de anilina (pH: 4,5)

anilina (Sigma, ref. A9880)	1 M
ácido acético	0,8 M

4.12 Microscopía electrónica de transmisión

Para observar las alteraciones estructurales que el tratamiento con AFP provoca en las células del hongo *Magnaporthe grisea*, se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión, en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- se crece el hongo en una placa de microtitulación de 96 pocillos (descrito en el apartado 4.2). Después de 6 horas de pregerminación se añade la proteína AFP a una concentración final de 50nM (IC₅₀). También se crecen cultivos control sin tratar
- se incuba la placa durante 24 h a 28°C
- se fijan las muestras en una solución 1,5% de glutaraldehído preparado en medio PDB, durante aproximadamente 18 h, a 4°C
- se incluye el material en una burbuja de agar al 2,5% para facilitar la manipulación (siguiendo el protocolo descrito por Hernández Mariné, 1992).
- se hacen 4 lavados de 10 minutos a 4°C en tampón cacodilato sódico 0,1M
- se realiza una pos fijación con tetróxido de osmio a 4°C durante 3h
- se hacen 4 lavados de 10 minutos a 4°C con agua destilada
- se realiza una deshidratación en acetona a diferentes concentraciones, a temperatura ambiente sin agitación, y en este orden:
 - 50%: una vez de 10 min
 - 70%: dos veces de 10 min
 - 90%: 3 veces de 10 min
 - 96%: 3 veces de 10 min
 - 100%: 3 veces de 15 min
- se hace la inclusión en resina SPURR (Spurr, 1969) a diferentes concentraciones, a temperatura ambiente con agitación suave, y en este orden:
 - 30%: 18 h
 - 50%: una vez de 5 h, y otra de 3 h
 - 70%: 5 h
 - 100%: 18 h
 - 100%: 4 h
- se cortan los bloques de resina y se secan durante 2 o 3 días a 60°C
- se hacen los cortes semifinos* (de 0,5 µm de grosor) y se tiñen con azul de metileno para visualizar al microscopio óptico
- se escogen las regiones con más material para los cortes ultrafinos
- se hacen los cortes ultrafinos* (de 80 nm de grosor) con un cuchillo de diamante
- se colocan sobre rejillas de cobre de 200mesh y se contrastan con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo

- se guardan las rejillas a temperatura ambiente hasta su observación en el microscopio Hitachi, modelo H 600AB (Japón), con un potencial de aceleración de 75KeV

* tanto los cortes semifinos, como los ultrafinos se hicieron por el equipo de la Dra. Núria Cortadellas de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona.

Tampón cacodilato sódico 0,2M

Na(CH₃)₂AsO₂-3H₂O 4,28 %

pH 7,4 con HCl (para 100 mL de volumen final, añadir 5,6 mL de HCl 0,2 N)

Muy tóxico, trabajar siempre bajo campana

Solución de post-fijación

tetróxido de osmio 1 %

FeCNK 0,8 %

preparado en tampón cacodilato sódico 0,1M

5 - Estudios con células humanas

5.1 Tratamiento de células humanas (HeLa) con AFP.

En este trabajo se han utilizado células humanas HeLa crecidas en monocapa adheridas a un sustrato. Todo el proceso se realiza bajo estricta esterilidad y con condiciones de cultivo constantes de 37°C de temperatura y una atmósfera de CO₂ del 5%.

5.1.1 Conservación del stock de células

Las células HeLa se guardan en alícuotas congeladas a -80°C. En el momento de empezar un cultivo se descongela una alícuota y se pasa a placa de Petri de 100mm de diámetro con medio D-MEM. El protocolo utilizado para la preparación de estas alícuotas del "stock" de células es el siguiente:

- se lava con 10 mL de PBS 1X a temperatura ambiente una placa de cultivo con células HeLa (en un estadio de confluencia del 90% aproximadamente)
- se pone 1 mL de tripsina-EDTA y se incuba durante 5-10 minutos a 37°C
- se pasa el líquido con las células a un tubo de polipropileno de 15mL y se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1000 rpm
- se elimina el sobrenadante, y se resuspenden las células en 2 mL de PBS 1X
- se vuelve a centrifugar como antes
- se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 3 mL de medio D-MEM con 10% de DMSO estéril y 30% de suero fetal bovino
- se hacen alícuotas de 1 mL y congelar a -80°C

Material y Métodos

La descongelación de las células se debe hacer de manera rápida, de modo que se pasa una alícuota congelada a -80°C directamente a un baño-maría a 37°C , y una vez descongeladas se les añade 9 mL de medio D-MEM previamente atemperado. Se cultivan en una placa de Petri.

5.1.2 Mantenimiento de las células

Las células se transfieren a medio fresco 2 veces a la semana, antes de que lleguen a confluencia, siguiendo el protocolo:

- se lava la placa 2 veces con 10 mL de PBS 1X estéril
- se pone 1 mL de tripsina-EDTA y se incuba 5-10 minutos a 37°C
- se adicionan 9 mL de medio D-MEM previamente atemperado a 37°C
- se disgregan las células por pipeteado suave, 3-4 veces
- se siembra la dilución deseada, normalmente 1/10 y 1/20 (1 mL de células + 9 mL de medio y 0,5 mL de células + 9,5 mL de medio respectivamente).

Solución PBS 1X

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$, H_2O	1,6 mM
PO_4HNa_2 , $2\text{H}_2\text{O}$	8,4 mM
NaCl	0,15 M
pH 7,4	

Solución tripsina-EDTA

EDTA	500 nM
NaCl	125 mM
KCl	4,65 mM
Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$	0,93 mM
Tris-HCl	18,6 mM
Tripsina (Sigma)	0,025%

Medio D-MEM

medio D-MEM	500 mL
suero fetal bovino inactivado por calor	50 mL
L-glutamina 200 mM	5 mL
penicilina-estreptomicina*	5 mL

* 10000 unidades/mL penicilina y 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, utilizando penicilina G y sulfato de estreptomicina

5.1.3 Tratamiento de células HeLa con AFP y tinción con el colorante sytox green

Para realizar este ensayo, se incubaron células HeLa con diferentes concentraciones de la proteína AFP y se sometieron a tinción con el colorante fluorescente verde sytox green. Este colorante se une a DNA una vez está dentro de las células, pero es incapaz de atravesar las membranas plasmáticas si estas se encuentran en perfecto estado. En células en las que la membrana plasmática se encuentra dañada, el sytox green es capaz de penetrar y se puede visualizar el núcleo marcado en verde. Para realizar este ensayo se utilizó el protocolo siguiente:

- antes de empezar, se pone 1 cubreobjetos redondo dentro de cada pocillo de una placa NUNC de 24 pocillos con ayuda de pinzas estériles, y se deja esta placa abierta en una cámara de flujo laminar con el UV durante 30 minutos.
- después de los 30 minutos, se pone en cada pocillo 1 mL de medio D-MEM con 100.000 células.
- se incuba la placa a 37°C y en una atmósfera de CO₂ de 5% durante aproximadamente 24h.
- se cambia el medio de los pocillos, y en aquellos que vayan a ser tratados con la proteína AFP, se añade el medio ya conteniendo la cantidad deseada de proteína
- se incuba nuevamente la placa en las mismas condiciones, durante aproximadamente 15h.
- después de ese tiempo, se trata las células control con 1% de triton (100 µL de triton 10% en cada pocillo). Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- se añaden 40 µL del colorante sytox green a una concentración de 5 µM (concentración final de 0,2 µM) y se incuba la placa en oscuridad con una agitación suave a temperatura ambiente durante 15 minutos
- se lava 2 veces los pocillos con 1 mL de PBS1X y se pone 1 mL de fijador (4% de paraformaldehído en PBS1X).
- se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- se lava 2 veces con PBS1X, se escurre un poco los cubre objetos en papel de filtro y se monta en un portaobjetos con 6 µL de mowiol.
- se seca 15 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz antes de observar al microscopio. Estos portaobjetos se pueden guardar a 4°C protegidos de la luz.

6- Estudios con plantas

6.1 Tratamiento de protoplastos de arroz con AFP.

De la misma manera que en el estudio con células humanas, el ensayo con protoplastos se realizó utilizando el colorante sytox green, con la finalidad de observar las células de arroz después del tratamiento con AFP. Se considera que los protoplastos donde se observa el núcleo marcado de color verde están muertos o presentan daños estructurales en la membrana.

6.1.1 Obtención de protoplastos de arroz

6.1.1.1 Esterilización de semillas de arroz

- se descortican semillas de arroz manualmente
- en condiciones de esterilidad se incuban en etanol 70% (marca Carlo Erba) en tubos de polipropileno de 50 mL durante 1 minuto
- se sustituye el etanol por una solución de hipoclorito sódico 30% y los tubos se incuban a temperatura ambiente en posición horizontal durante 30 minutos con agitación orbital de 150 rpm.
- se lava con abundante agua estéril 2 o 3 veces, y se vuelve a incubar en las mismas condiciones, en agua estéril durante 1h.
- se vuelve a lavar como antes y se siembran con pinzas estériles en jarras con el medio deseado.

6.1.1.2 Obtención de protoplastos de arroz

- se germinan semillas de arroz previamente desinfectadas en jarras con medio MS
- cuando el coleóptilo alcanza un tamaño de aproximadamente 5 cm, se cortan en fragmentos de 1 cm
- se incuba en 8 mL de solución enzimática por peso fresco, con agitación orbital constante de 50 rpm, a 24°C y en oscuridad
- se filtra con una malla de nylon de 63 µm
- se añade al líquido filtrado 15 mL de medio W5 y se centrifuga durante 5 minutos a 80 g
- se resuspende el precipitado en 8 mL de medio W5 + 0,6M de sacarosa y se repite la centrifugación anterior
- se recupera la interfase y se cuentan los protoplastos en una cámara de Nageotte
- se ajusta la densidad de protoplastos a $1,6 \times 10^6$ protoplastos/mL con medio CPW13M, y se guardan en oscuridad a 24 °C

Solución enzimática

celulasa Onozuka RS*	2%
macerozyme*	0,5%

manitol 13 %
pH 5,6
* ambos de la marca Yakult Onza

Medio W5

NaCl 9 g/L
CaCl₂ 18,3 g/L
KCl 0,37 g/L
glucosa 0,99 g/L
pH 6,0

Medio CPW13M

K₂HPO₄ 0,16 mM
KNO₃ 1 mM
CaCl₂ 10 mM
MgSO₄ 1 mM
KI 1 μM
CuSO₄ 0,1 μM
manitol 71 mM
pH 5,8

6.1.2 Tratamiento de protoplastos de arroz con AFP y tinción con el colorante sytox green

- en un tubo de 1,5 mL se pone 1 mL de la suspensión de protoplastos a una concentración de $1,6 \times 10^6$ protoplastos/mL y se añade la proteína AFP a la concentración deseada.
- se incuba a 28°C durante 16-18h en oscuridad
- se añade el colorante sytox green a una concentración final de 0,2 μM, y se incuba en oscuridad con una agitación suave a temperatura ambiente durante 15 minutos
- se observa al microscopio confocal

6.2 Transformación de plantas de arroz.

Los métodos descritos a seguir se utilizaron para la obtención de plantas transgénicas de arroz de la variedad Senia. Esta parte del trabajo se desarrolló por la Dra. Joaquina Messeguer y su grupo en el laboratorio de Biología Molecular del IRTA en Cabrils.

6.2.1 Obtención de callos embriogénicos a partir del escutelo del embrión zigótico maduro

- se decortican aproximadamente 200 semillas de arroz
- en condiciones de esterilidad, se incuban las semillas en etanol 70% durante 1 minuto

Material y Métodos

- se transfieren las semillas a un erlenmeyer estéril con una solución de lejía comercial diluida al 16% en agua destilada con una gota de detergente Tween 20 para cada 100 mL. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación orbital de 150 rpm
- se hacen 2 o 3 lavados de 10 minutos con abundante agua estéril
- se siembran las semillas individualmente en tubos de 9mL de capacidad con 2 mL de medio N6 para la inducción del callo e incuban a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante una semana en oscuridad
- se transfieren las semillas que han germinado correctamente a placas de Petri de 9 cm con 25 mL de medio N6 (de 8 a 10 semillas por placa) y se incuban en las mismas condiciones durante 2 semanas
- pasado ese tiempo se forman callos primarios de 0,5-1 cm de donde se seleccionan las unidades embriogénicas para la transformación, con ayuda de una lupa y en condiciones de esterilidad. Se transfieren las unidades embriogénicas seleccionadas a placas de Petri de 9 cm con 25 mL de medio N6 (15-20 nódulos por placa) y se incuban a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante dos semanas en oscuridad hasta que adquieran la talla necesaria para la transformación. Estas unidades embriogénicas deben cumplir ciertos requisitos para garantizar una alta eficiencia de transformación:
 - . talla entre 0,8 y 1,6 mm: los más grandes ya están en un estadio de desarrollo muy avanzado y resultan en frecuencias de transformación bajas, mientras que los más pequeños no soportan el impacto de la transformación
 - . forma esférica y superficie lisa: los de formas más complejas y rugosos también están en un estadio muy avanzado de diferenciación y no se deben utilizar
 - . color beige y ligeramente translúcidos: los blancos o amarillentos y opacos se tienen que eliminar
 - . textura compacta y resistentes a la manipulación con las pinzas: hay que evitar los callos friables no resistentes a la manipulación, y los viscosos y cristalinos que ya están diferenciados para formar estructuras de raíz

6.2.2 Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizaron los callos embriogénicos descritos en el apartado anterior, utilizando el protocolo a seguir.

. Cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*:

- se siembra la cepa deseada de *A. tumefaciens* previamente transformada con la construcción a ser introducida en las plantas, a partir de un "stock" glicerinado, en una placa de Petri con medio LB sólido suplementado con los antibióticos necesarios
- se incuban a 28°C por 2 días

- a partir de una colonia aislada de la placa anterior, se hace un inóculo en 50 mL de medio LB líquido con los correspondientes antibióticos y se incuba en agitación constante de 250 rpm a 28°C durante una noche
- se hace una dilución de este cultivo en otro erlenmeyer con 50mL de medio LB líquido, para tener un cultivo con una D.O. de 0,1 a 600 nm, lo que corresponde a cerca de 10^8 bacterias/mL.
- se centrifuga este cultivo durante 10 minutos a 3000 rpm y se resuspende el precipitado en 40 mL de medio N6 líquido + AC
- se ponen en una placa de Petri de 5 cm, 15 mL del cultivo bacteriano y se sumergen los callos embriogénicos (100 por construcción), y se incuban durante 15-20 minutos
- se secan suavemente los callos sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y se disponen en placas de Petri de 9 cm con 25 mL de medio de cocultivo N6 + AC (15 a 20 callos por placa).
- se incuban las placas selladas con Parafilm™ durante 3 días en oscuridad y a $28 \pm 2^\circ\text{C}$

. Selección de los callos transformados y obtención de plantas:

- se disponen de 15 a 20 callos transformados en placas de Petri de 9 cm con 25 mL de medio N6+H+Cf+T (cerca de 20 placas por cada ensayo de transformación) y se incuban en oscuridad durante 12-15 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$
- después de este tiempo, se vuelve a transferir los callos a nuevas placas de Petri con el mismo medio, y se incuban durante 2 semanas más
- a partir de aquí empieza el proceso de regeneración de los callos transformados. Se transfieren aquellos que presentan un crecimiento activo al medio de pre-regeneración (N6-PR + H) y se incuban durante 1 semana en las mismas condiciones
- se transfieren al medio de regeneración (N6-R + H), incubar 2 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad, y se pasan a la luz (con un foto periodo de 16h luz: 8h oscuridad) durante 3-6 semanas
- a medida que aparecen las plantas, estas se individualizan de los callos y se transfieren a tubos de cultivo de 62 mL de capacidad con 8 mL de medio N60 + H para estimular el desarrollo de las raíces
- 1 semana después, se pasan las plantas a un sustrato adecuado de aclimatación en semilleros con capacidad para 60 plantas, y en condiciones de alta humedad donde permanecen 15 días antes de ser transferidas definitivamente a macetas con el sustrato de arroz descrito en el apartado 2.3 de "material". El proceso de aclimatación de las plantas se hace reduciendo gradualmente la humedad relativa para evitar un choque hídrico.

Material y Métodos

6.2.3 Transformación por biolística

Se disponen las unidades embriogénicas seleccionadas (apartado 5.1.1), 4 horas antes del bombardeo, en el centro de una placa de Petri con medio N6 bomb., a 0,7cm del centro de la placa, formando un círculo de 1cm de diámetro. Esta es la disposición ideal para que los callos reciban los disparos de manera homogénea, y la composición del medio N6 bomb., suplementado con manitol y sorbitol, cambia la condición osmótica de las células reduciendo los daños causados por el impacto de las micro partículas de oro.

Preparación de las micropartículas de oro

- se pesan en una balanza de precisión, en un *ependorf* siliconado, 1,5 mg de micro partículas de oro de 1 μ m de diámetro, y 1,5 mg de partículas de 1,6 μ m de diámetro
- se añade 1 mL de etanol absoluto y se sonican las micro partículas durante 30 segundos
- se deja que precipiten durante 1 hora
- se retira el etanol y se añade 500 μ L de agua MilliQ autoclavada
- se vuelve a sonicar y se dejar precipitar
- se retira el agua, se vuelve a añadir 50 μ L de agua y se sonica durante 30 segundos
- con agitación constante al vórtex, se añade 10 μ L del DNA a utilizar a una concentración de 0,5 μ g/ μ L; 20 μ L de espermidina a 0,1 M y 50 μ L de CaCl₂ a 2,5 M.
- se deja que precipiten las micro partículas manteniendo el *ependorf* en hielo durante cerca de 10 minutos
- se centrifuga durante 10 segundos y se descarta el sobrenadante
- se resuspenden las micro partículas de oro ya recubiertas de DNA, en 38 μ L de etanol absoluto, sonicando brevemente
- se ponen las micro partículas ya recubiertas de DNA en el centro de cada una de las 4 membranas que se utilizarán par los disparos (2 por placa de callos, y 2 placas por construcción)
- se deja que se evapore completamente el etanol

Realización del bombardeo

Los parámetros utilizados fueron los siguientes: vacío a una presión de 27 *inches* de mercurio, disco de ruptura de 1100 psi, posición del soporte con la placa de Petri a 6 cm del disco de parada, y dos disparos por placa de Petri.

Todo el material utilizado en el bombardeo (discos de parada, discos de ruptura, membranas, soportes metálicos para las membranas y para los discos de ruptura) se esterilizó previamente con alcohol absoluto, y la cabina de flujo laminar se limpió con etanol 70%.

Material y Métodos

- se dispone el disco de ruptura sobre su soporte y se acopla en el orificio de entrada del helio
- se dispone el disco de parada en el fondo de su soporte metálico y se acopla boca abajo asegurándose de que quede bien apretado. Se coloca dentro de la cámara de disparo
- a 6 cm del disco de parada se coloca la placa de Petri con los callos y se cierra la puerta. Se hace el vacío hasta alcanzar los 27 *inches* de presión y se dispara hasta que se rompa el disco de ruptura
- se deshace el vacío y se repite el proceso girando de 90° la placa con los callos
- una vez finalizados los disparos, se sellan las placas con Parafilm™ y se incuban a 28°C durante 16-20h

Selección de los callos transformados y obtención de plantas:

Se hace esencialmente como descrito en el apartado de transformación por *Agrobacterium tumefaciens*, con la única diferencia que el medio de selección no contiene cefotaxima ni ácido clavulánico.

6.2.4 Medios de cultivo

	N6	N60	N6-PR	N6-R	N6-bomb
macroelementos* ¹ (mL/L)	100	100	100	100	100
microelementos* ² (mL/L)	10	10	10	10	10
FeNaEDTA (mL/L)	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7
tiamina (mL/L)	4	4	4	4	4
myo-inositol (mg/L)	100	100	100	100	100
hidrolizado de caseína (mg/L)	300	300	300	300	300
prolina (mg/L)	500	500	500	500	500
glutamina (mg/L)	500	500	500	500	500
2,4 D (mL/L)	18,2	-	-	-	-
AIA (mL/L)	-	-	2,85	2,85	-
ABA (mg/L)	-	-	10	-	-
BA (mL/L)	-	-	13,26	13,26	-
manitol (g/L)	-	-	-	-	72,88
sorbitol (g/L)	-	-	-	-	72,88
sacarosa (g/L)	30	30	30	30	30
gelrite (g/L) (medio solido)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6

Macroelementos*¹

KH ₂ PO ₄	4 g/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,66 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,85 g/L

Material y Métodos

KNO ₃	28,3 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,63 g/L

Microelementos*²

MnSO ₄ , 4H ₂ O	2,23 g/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,86 g/L
H ₃ BO ₃	0,62 g/L
KI	0,083 g/L
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,025 mg/L
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,0025 mg/L
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0025 mg/L

FeNaEDTA: 2,5g/L

Tiamina (o vitamina B1): 10⁻⁴ M

2,4D (2,4 dicloroferroacético): 5x10⁻⁴ M (disuelto en etanol absoluto)

AIA (ácido 3-indolacético): 10⁻³ M (disuelto en etanol absoluto)

BA (6-benzilaminopurina): 10⁻³ M (disuelto en HCl 0,5 N)

ABA (ácido abscísico): 1 mg/mL (disuelto en NaOH 1 N)

Suplementos de los medios:

Rifampicina (rif): 100 mg/L

Higromicina (H): 40 mg/L

Kanamicina (Kan): 50 mg/L

Cefotaxima (CF): 250 mg/L

Ácido clavulánico (T): 100mg/L

Acetosiringona (AC): 19,62 mg/L

7- Ensayos de resistencia de plantas de arroz transgénicas expresando el gen *afp* frente a la infección por *Magnaporthe grisea*.

7.1 Ensayo en hoja cortada

El ensayo de resistencia en hojas cortadas de arroz se hace tal y como se ha descrito en el apartado 2 de material y métodos (análisis histoquímico de la expresión del gen *uidA* en hojas tratadas con esporas o elicitores). Para este ensayo se utilizaron inóculos de esporas de *M. grisea* a diferentes concentraciones (10⁴, 10⁵ y 10⁶ esporas/mL).

7.2 Ensayo en planta entera

El ensayo en plantas enteras de arroz transgénicas expresando el gen *afp*, se hizo pulverizando las plantas con una solución de esporas a una concentración de 10^4 esporas/mL y 0,02% de detergente tween 20, poniendo 5 mL de esta solución en las plantas de cada una de las macetas del ensayo.

Después del inóculo con las esporas, las plantas se mantienen en una cámara de metacrilato cerrada, en un ambiente con 95% de humedad, a una temperatura de 28°C. Esta cámara de metacrilato se mantiene en oscuridad durante 2 días, y después en condiciones de fotoperíodo de 12h/luz y 12h/oscuridad.

La aparición de los síntomas de la infección se siguió visualmente.

"Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*"

**Ana Beatriz Moreno, Álvaro Martínez del Pozo,
Marisé Borja, Blanca San Segundo**

Publicado en *Phytopathology*, 93: 1344-1353, 2003.

Resumen

La podredumbre gris (*Botrytis Blight*) causada por el hongo *Botrytis cinerea*, es una de las enfermedades más frecuentes en las plantas ornamentales. En plantas de geranio, esta enfermedad es responsable de importantes pérdidas en la producción. El hongo *Aspergillus giganteus* produce y secreta una proteína básica de bajo peso molecular, la proteína antifúngica AFP (antifungal protein). En este trabajo, se investigan las propiedades antifúngicas de la proteína AFP frente a varios aislados de *B. cinerea* obtenidos de geranios infectados de modo natural. La AFP inhibe fuertemente tanto el crecimiento del micelio, como la germinación de los conidios de *B. cinerea*. La observación microscópica de cultivos de este hongo tratados con AFP revela la presencia de hifas de menor longitud con ensanchamientos en las puntas de las hifas. Experimentos en los que *B. cinerea* se incubó con AFP por diferentes periodos de tiempo, retirándose después del medio de crecimiento, revelaron una actividad fungicida de la AFP. La aplicación de AFP en plantas de geranio protegió las hojas de una infección por *B. cinerea*. La proteína cecropina A también se mostró efectiva frente a este patógeno. Se observó un efecto aditivo cuando la AFP se combinó con la cecropina A. Estos resultados se discuten en relación al potencial del gen *afp* para aumentar la protección de plantas frente a enfermedades causadas por *Botrytis cinerea*.

