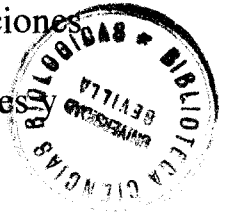


Universidad de Sevilla  
Facultad de Biología  
Departamento de Genética

Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas  
Instituto de Recursos Naturales  
Agrobiología de Sevilla



**Caracterización del gen de la quitinasa CHIT42 del hongo  
antagonista *Trichoderma harzianum* y análisis de su expresión  
en plantas de tabaco.**

Trabajo presentado por la licenciada Irene García Fernández para optar al  
grado de Doctor en Biología

20 17  
27 FEB. 1997

*Jose Antonio Pintor Toro*

El Director de Tesis

El doctorando

*Jose Antonio Pintor Toro*

*Irene Garcia Fernandez*

Dr. José Antonio Pintor Toro  
Investigador Científico del CSIC

Irene García Fernández

TD

TD-374



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA QUITINASA CHIT42 DEL HONGO ANTAGONISTA *Trichoderma hamiformis* Y ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN EN PLANTAS DE sea consultada, según la modalidad/es indicadas: TABACO

Irene García Fdez.

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 12 de SEPTIEMBRE de 1997

## **ÍNDICES**

## INTRODUCCIÓN

1. El hongo antagonista <i>Trichoderma</i> spp.	1
1.1. Características generales e interés agronómico.	1
1.2. Antagonismo y micoparasitismo.	4
1.2.1. Competición.	5
1.2.2. Antibiosis.	5
1.2.3. Micoparasitismo.	6
1.3. Enzimas hidrolíticas asociadas al proceso del micoparasitismo.	8
1.3.1. La pared celular de los hongos.	8
1.3.2. Enzimas hidrolíticas de polímeros de la pared celular de los hongos.	9
1.3.2.1. Las $\beta$ -glucanasas.	10
1.3.2.2. Las quitinasas.	12
1.4. Efecto sinérgico de las quitinasas de <i>Trichoderma</i> con otras hidrolasas y otros compuestos antimicrobianos.	14
2. La defensa de las plantas ante los hongos fitopatógenos.	16
2.1 Mecanismos de ataque de los fitopatógenos.	16
2.1.1. Mecanismos de penetración de los hongos. Enzimas implicadas.	17
2.2 Mecanismos de defensa de las plantas	19
2.2.1. Reconocimiento. Hipótesis gen a gen.	19
2.2.2. Respuesta.	22
2.2.2.1. Liberación de formas activas de oxígeno.	22
2.2.2.2. La respuesta hipersensible	23
2.2.2.3. Fortalecimiento de la pared celular.	24
2.2.2.4. Producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas	24
2.2.2.5. Producción de proteínas relacionadas con la patogénesis.	25
2.2.3. Respuesta a largo plazo. la respuesta sistémica adquirida.	26
3. Hidrolasas inducidas por patógenos	28
3.1. $\beta$ -1,3 glucanasas	28
3.2. Quitinasas.	29
3.3. Efecto sinérgico de las quitinasas vegetales y otras sustancias antimicrobianas.	34

## MATERIALES Y MÉTODOS

1. Organismos	37
1.1. Bacterias.	37

1.2. Hongos filamentosos	37
1.3. Plantas.	38
2. Medios de cultivo. Mantenimiento de las muestras y obtención de material.	38
2.1. Bacterias.	38
2.2. Hongos fitopatógenos	38
2.2.1. Cultivo sólido. Esporulación.	38
2.2.2. Cultivo líquido.	38
2.3. Plantas.	39
2.3.1. Esterilización de semillas.	39
2.3.2. medio Hoagland. Cultivo hidropónico.	39
2.3.3. Cultivo <i>in vitro</i> .	40
3. Extracción de DNA.	40
3.1. Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .	40
3.2. Obtención de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .	41
3.3. Obtención de DNA de fagos.	41
3.4. Obtención de DNA genómico de hongos.	42
3.5. Obtención de DNA genómico de plantas.	42
4. Extracción de RNA.	43
4.1. Extracción de RNA de <i>Trichoderma</i> .	43
4.2. Extracción de RNA de plantas	44
5. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.	44
5.1. PCR a partir de fagos.	44
5.2. PCR a partir de bacterias.	45
5.3. PCR a partir de DNA genómico de <i>Trichoderma</i> .	45
5.3.1. Diseño de los oligonucleótidos.	45
5.3.2. Recacción de amplificación.	46
6. Manipulación de DNA	46
6.1. vectores.	46
6.2. Restricción.	47
6.3. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.	47
6.4. Generación de extremos romos.	47
6.4.1. Relleno de extremos 5' prominentes	47
6.4.2. Degradación de extremos 3' prominentes	47
6.5. Desfosforilación de plásmidos.	48
6.6. Ligaciones.	48
6.7. Deleciones seriadas de DNA	48
6.8. Secuenciación del DNA.	49
6.8.1. Desnaturalización de la muestra.	49

6.8.2. Geles de secuenciación.	50
7. Mutagénesis dirigida.	50
7.1. Mutagénesis <i>in vitro</i> .	50
7.1.1. Obtención de DNA monocatenario.	51
7.1.2. Síntesis de la cadena mutante.	52
7.2. Mutagénesis por PCR.	53
8. Análisis Southern.	53
8.1. Preparación del filtro.	53
8.1.1. Digestión de DNA genómico y electroforesis.	53
8.1.2. Transferencia del DNA a membranas.	54
8.1.3. Filtros de productos de PCR.	54
8.2. Hibridación y lavados.	54
9. Análisis Northern.	55
9.1. Electroforesis desnaturalizante de RNA y transferencia a filtro.	55
9.2. Hibridación y lavados.	56
10. Hibridación de colonias.	56
11. Escrutinio de genotecas.	57
12. Transformación de bacterias.	57
12.1. Transformación de <i>E. coli</i> .	57
12.1.1. Preparación de células competentes.	57
12.1.2. Transformación de <i>E. coli</i> .	58
12.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .	58
12.2.1. Preparación de células competentes.	58
12.2.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .	58
12.2.3. Comprobación de <i>A. tumefaciens</i> .	59
13. Transformación de plantas de tabaco.	59
13.1. Preparación de las células de <i>A. tumefaciens</i> .	59
13.2. Transformación de discos de hojas de tabaco.	59
13.3. Aislamiento y regeneración de plantas de tabaco transformadas.	60
14. Análisis de proteínas.	60
14.1. Extracción de proteínas de plantas.	60
14.1.1. Extracción de proteínas totales.	60
14.1.2. Extracción de proteínas extracelulares de hojas.	61
14.2. Cuantificación de proteínas.	62
14.2.1. Método de Bradford.	62
14.2.2. Método de Lowry modificado.	62
14.3. Electroforesis monodimensional de proteínas.	62
14.4. Detección de proteínas en gel. Tinción con azul de Coomassie.	63

15. Análisis Western.	63
15.1. Obtención de anticuerpos.	63
15.1.1. Obtención del suero anti-CHIT42.	63
15.1.2. Purificación por afinidad de anticuerpos.	64
15.2. Transferencia de proteínas a membranas.	64
15.3. Inmunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina.	65
16. Tissue-printing.	65
16. 1. Preparación del filtro.	65
16.2. Inmunodetección.	66
17. Obtención de proteína de fusión GST-CHIT42.	66
17.1. Descripción del sistema de expresión heteróloga.	66
17.2. Obtención y análisis de los transformantes	66
17.3. Purificación de la proteína de fusión GST-CHIT42.	66
18. Microscopía electrónica.	68
18.1. Fijación del material.	68
18.2. Tratamiento de las secciones.	68
19. Ensayos de la actividad quitinasa en plantas transgénicas.	69
19.1. Método de la quitina coloidal.	69
19.2. Método de la MeUmbQ.	69
20. Análisis funcional de las plantas transgénicas.	70
20.1. Ensayos de resistencia de germínulas al hongo <i>Rhizoctonia solani</i> .	70
20.1.1. Preparación de cajas con <i>Rhizoctonia solani</i> .	70
20.1.2. Infección	70

## RESULTADOS

1. Aislamiento y caracterización molecular del gen <i>chit42</i> .	74
1.1. Aislamiento del cDNA <i>chit42</i> por PCR.	74
1.1.1. Diseño de los oligonucleótidos.	74
1.1.2. Amplificación por PCR y clonación de una banda específica de DNA.	75
1.1.3. Aislamiento de clones de cDNA de CHIT42	76
1.2. Secuencia del cDNA de CHIT42.	79
1.2.1. Análisis de la secuencia.	81
1.2.2. Homología de CHIT42 con otras proteínas.	81
1.3. Análisis de la expresión de <i>chit42</i> en <i>Trichoderma harzianum</i> .	83
1.4. Presencia del gen <i>chit42</i> en otras especies de <i>Trichoderma</i> y en la especie afín <i>Gliocladium virens</i> .	85

2. Expresión de la quitinasa CHIT42 en plantas de tabaco.	87
2.1. Plantas CHIT42.	87
2.1.1. Construcción de plantas CHIT42.	87
2.1.2. Transformación de plantas con la construcción CHIT42.	89
2.1.3. Cuantificación de la expresión de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas CHIT42.	90
2.1.4. Determinación de la actividad quitinasa de las plantas CHIT42.	90
2.2. Plantas psCHIT42.	92
2.2.1. Mutagénesis.	92
2.2.1.1. Mutagénesis <i>in vitro</i> del cDNA <i>chit42</i> .	92
2.2.1.2. Mutagénesis por PCR del cDNA pTE28.1.	94
2.2.3. Construcción psCHIT42.	96
2.2.3.1. Eliminación de la diana <i>SmaI</i> del polilinker de pS2.	96
2.2.3.2. Construcción psCHIT42	97
2.2.3.3. Construcción psCHIT42 en pBI221 y en Bin19.	98
2.2.4. Transformación de plantas de tabaco con la construcción psCHIT42.	99
2.2.5. Expresión de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas psCHIT42.	100
2.2.6. Determinación de la actividad quitinasa de las plantas transgénicas psCHIT42.	100
2.2.7. Resumen: Análisis comparativo de los niveles de expresión y la actividad quitinasa de las plantas CHIT42 y psCHIT42.	101
2.3. Localización de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas.	104
2.3.1. Solubilización de la proteína en diferentes tampones.	104
2.3.2. Localización de la proteína en diferentes extractos celulares.	104
2.3.3. Localización de la proteína CHIT42 en impresiones de tejido en filtros de nitrocelulosa.	105
2.3.3.1. Purificación del anticuerpo.	105
2.3.3.2. Inmunolocalización de la quitinasa CHIT42 en impresiones de tejido en filtros de nitrocelulosa.	106
2.3.4. Inmunolocalización de la proteína CHIT42 al microscopio electrónico en plantas transgénicas.	106
2.4. Acumulación del mRNA CHIT42 en las plantas transgénicas.	107
3. Ensayos de actividad antifúngica de las plantas transgénicas.	109



## **DISCUSIÓN**

1. Aislamiento y caracterización del cDNA CHIT42	114
1.1. Secuencia del clon CHIT42	114
1.2. Regulación de la expresión de <i>chit42</i> .	116
1.3. Presencia del gen <i>chit42</i> en otras especies de hongos micoparásitos	118
2. Plantas transgénicas CHIT42 y psCHIT42	119
2.1. Expresión de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas.	120
2.2. Localización de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas.	121
2.3. Expresión del mRNA CHIT42 en plantas transgénicas	123

## ÍNDICE DE TABLAS.

1. Hongos fitopatógenos controlados por diferentes especies de *Trichoderma harzianum*.
2.  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanasas de *Trichoderma harzianum*.
3. Actividades quitinolíticas de *Trichoderma harzianum*.
4. Hidrolasas de hongos fitopatógenos.
5. Genes de avirulencia aislados de hongos.
6. Genes de resistencia al ataque de hongos fitopatógenos
7. Proteínas PR de plantas.
8. Efecto antifúngico de quitinasas aisladas de plantas.
9. Estirpes de *E. coli* y *A. tumefaciens* y sus genotipos.
10. Hongos filamentosos utilizados.
11. Resumen de las propiedades de las quitinasas purificadas de *Trichoderma harzianum* CECT2413.
12. Resumen de las actividades quitinasa extracelulares en diversas fuentes de carbono.
13. Características de los oliginucleótidos "sentido" y "antisentido".
14. Identidad de CHIT42 con otras quitinasas y con la subunidad a de la toxina *killer* de *K. lactis*.
15. Plantas utilizadas para la localización de la proteína CHIT42 al microscopio electrónico.
16. Plantas utilizadas para el ensayo de resistencia de germínulas frente al ataque de *R. solani*.
17. Porcentajes de supervivencia de las plantas control y transgénicas en cajas con *R. solani* 0.75 mg/ml.

## ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Enrollamiento y penetración de hifas de *Trichoderma hamatum* en hifas de *Rhizoctonia*.
2. Esquema de la pared celular vegetal.
3. Esquema de los mecanismos de defensa de las plantas.
4. Estructura de las quitinasas de plantas.
5. Extracción de proteínas extracelulares de hojas.
6. Ensayos de resistencia de plántulas de tabaco a la infección por *Rhizoctonia solani*.
7. Actividad lítica sobre paredes celulares de *B. cinerea* de las quitinasas CHIT42, CHIT37 y CHIT33.
8. Obtención de una banda específica.
9. Clon PCR3CHIT42.
10. PCR de los fagos. Hibridación con la sonda PCR3CHIT42.
11. Clonación de los fagos en pSK.
12. mapa de pCHIT42S.
13. Construcciones realizadas para la secuenciación de cDNA *chit42*.
14. Secuencia de nucleótidos del cDNA *chit42* y secuencia de aminoácidos deducida.
15. Perfil de hidrofobicidad de la secuencia de aa deducida de CHIT42.
16. Comparación de CHIT42 con otras quitinasas.
17. Southern-blot de *chit42*.
18. Represión catabólica de la transcripción de *chit42*.
19. Expresión de *chit42* en cultivos de *Trichoderma harzianum* que contienen diversos metabolitos intermediarios como única fuente de carbono.
20. Acumulación del mensajero *chit42* en presencia de productos relacionados con la quitina.
21. Acumulación del mensajero *chit42* cuando se cultiva *T. harzianum* en presencia de micelios autoclavados de hongos.
- 22a. Presencia del gen *chit42* en otras especies de *Trichoderma* y en *G. virens*.
- 22b. Acumulación del mRNA *chit42* en otras especies de *Trichoderma* y en *G. virens* cuando se cultivan en presencia de quitina.
23. Realización de la construcción pBI221-CHIT42.
24. Realización de la construcción pBin19-CHIT42.
25. Hibridación de colonias de *Agrobacterium* con pBin19-CHIT42.
26. Southern y tests de segregación de las plantas CHIT42.
- 27 Western de las plantas CHIT42.
28. Western de cuantificación.

29. Actividades quitinasa de las plantas CHIT42.
30. Esquema de las construcciones CHIT42 y psCHIT42.
31. Elección de la secuencia para la mutagénesis *in vitro* del cDNA *chit42*
32. Dirección de la replicación de la construcción pERV-1.
33. Mutagénesis de CHIT42.
34. Clon pTE28.1.
35. Mutagénesis por PCR.
36. Clonación del fragmento del péptido señal de pTE28.1 amplificado por PCR en pGEM-T.
37. Eliminación de la diana *Sma*I.
38. Esquema de la realización de la construcción ppsCHIT42.
39. Construcciones pBI-psCHIT42 y Bin19-psCHIT42.
40. Test de segregación de las plantas psCHIT42.
41. Western de las plantas psCHIT42.
42. Western de cuantificación de las plantas psCHIT42.
43. Gráfica de actividades quitinasa de las plantas psCHIT42.
44. Gráfica conjunta actividad-western.
45. Western de distintos órganos y etapas del desarrollo de las plantas transgénicas
46. Western de las plantas CHIT42 tratadas con ácido salicílico.
47. Western de extractos en tampón Laemmli y en tampón fosfato.
48. Western de extractos de proteínas extracelulares (EC) e intracelulares (IC) de las plantas transgénicas.
49. Inmunolocalización de la proteína CHIT42 en impresiones de tallo de las plantas CHIT42 10.1, psCHIT42 18 y control en filtros de nitrocelulosa.
50. Microfotografías de las plantas CHIT42 y psCHIT42.
51. Northern de las plantas CHIT42 y psCHIT42.
52. Resistencia de las plantas transgénicas a *R. solani* 0.75 mg/ml.
53. Secuencia amino-terminal de la proteína CHIT42.
54. Comparación de los péptidos señal de las proteínas CHIT42 y psCHIT42.
55. Análisis de las secuencias 5' y 3' no coificantes de las construcciones CHIT42 y psCHIT42

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. EL HONGO ANTAGONISTA *Trichoderma* spp.

### 1.1. Características generales e interés agronómico.

Las especies del género *Trichoderma* han sido objeto de intensos estudios, dadas sus numerosas aplicaciones prácticas. Su descubrimiento tuvo lugar durante la guerra de Corea, en el sudeste asiático, como consecuencia de los destrozos que producía en las ropas de algodón de los soldados y las tiendas de campaña. Más tarde, se encontró que este hongo, actualmente denominado *T. reesei*, excreta una batería de celulasas capaces de degradar la celulosa hasta obtener glucosa (Reese y Mandels, 1950).

El género *Trichoderma* agrupa una serie de especies de hongos filamentosos saprofiticos del suelo, que, por carecer de ciclo sexual conocido, se han incluido en el grupo de los Deuteromicetos u hongos imperfectos. Recientemente, sin embargo, se ha identificado al género *Hypocrea* como la forma perfecta de la forma imperfecta *Trichoderma*, por lo cual esta clasificación es incorrecta (Samuels, 1996).

La taxonomía de *Trichoderma* es aún muy imprecisa, dada la imposibilidad de realizar cruces genéticos con ellos. Una primera clasificación (Rifai, 1969), basada en criterios morfológicos, incluía nueve grupos o "agregados". Más tarde, y gracias al análisis de fragmentos de restricción del DNA mitocondrial (Meyer *et al.*, 1992), se establecieron cinco grupos que incluían nueve especies diferentes de *Trichoderma*: el grupo I formado por *T. reesei* y *T. todicta*; el grupo II, por *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii*; el grupo III, constituido por *T. virgatum*; el IV, por *T. saturnisporum*, y finalmente, el grupo V, constituido por *T. harzianum*.

El micelio de *Trichoderma* está formado por hifas tabicadas más o menos ramificadas, con células plurinucleadas. El número de cromosomas por núcleo se ha estudiado mediante técnicas de electroforesis en campo pulsante, y se han encontrado entre 5 y 7 cromosomas, según los grupos y las especies. Mäntylä *et al.*, 1993, encuentran 7 cromosomas en *T. longibrachiatum*. Herrera-Estrella *et al.*, 1993, encuentran 6 cromosomas en *T. harzianum* y *T. reesei*, y 5 en *T. viride*, mientras que, según Carter *et al.*, 1992, *T. reesei* tiene 7 cromosomas. Las diferencias encontradas en la misma especie puede ser una consecuencia de la inclusión artificial de diferentes cepas en la misma especie, debida a los criterios de clasificación del género, que, como se ha indicado previamente, no incluyen estudios de cruzamiento genético. Por otra parte, pueden existir cromosomas homólogos de distinto peso molecular en las especies diploides.

Las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por su versatilidad metabólica. Son capaces de utilizar una amplia gama de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno, incluidos, entre otros, mono o polisacáridos, purinas, pirimidinas, aminoácidos, ácidos orgánicos e incluso metanol y formiato, como fuente de carbono, y amonio, aminoácidos, urea, nitrato o nitrito, como fuente de nitrógeno (revisado en Papavizas, 1985).

Las esporas de *Trichoderma*, denominadas conidios, poseen generalmente un solo núcleo haploide (Rosen *et al.*, 1974), son ovoides, de color verde, y se forman sobre estructuras ramificadas denominadas conidióforos. La esporulación es fotoinducible, es decir, tiene lugar sólo en presencia de luz, preferiblemente visible o cercana al ultravioleta (Gressel y Hartmann, 1968), aunque también se puede inducir en ocasiones por falta de nutrientes (Horwitz *et al.*, 1985). Condiciones nutricionales o hídricas adversas permiten la formación de otro tipo de estructuras asexuales de resistencia, denominadas clamidosporas, cuyo papel ecológico no está lo suficientemente claro (Lewis y Papavizas, 1984).

La germinación de los conidios de *Trichoderma* se produce en numerosos sustratos. Sin embargo, la ausencia de germinación en agua destilada indica que la iniciación de este proceso requiere una fuente externa de nutrientes (Danielson y Davey, 1973). Las clamidosporas sólo son capaces de germinar en medios nutritivos (Lewis y Papavizas, 1983). La dormancia de las clamidosporas, que se interrumpe en presencia de nutrientes, es consecuente con su naturaleza de estructura de resistencia (Papavizas, 1985).

Las especies del género *Trichoderma* son ubicuas, y viven prácticamente en cualquier tipo de suelo, especialmente en hábitats ricos en materia orgánica. Son colonizadores secundarios, como lo indica su presencia en materia orgánica en descomposición. Se encuentran también en la superficie de raíces, en cortezas, especialmente si están dañadas, y asociados a propágulos de otros hongos. A pesar de su amplio nicho ecológico, la prevalencia de *Trichoderma* en un determinado hábitat depende de las condiciones físico-químicas del mismo, así como de la especie analizada (revisado en Papavizas, 1985).

Además de su ubicuidad y versatilidad metabólica, *Trichoderma* presenta una serie de características que lo convierten en un organismo de gran interés comercial. Algunas de sus especies producen grandes cantidades de celulasas, enzimas que degradan la celulosa hasta producir glucosa (Montenecourt, 1983). La utilización de las celulasas tiene gran interés en una serie de procesos industriales, como las fermentaciones alcohólicas, el procesamiento de la celulosa y el almidón, y la producción de zumos vegetales (Wood, 1989). Su capacidad de excretar proteínas y la existencia de mutantes deficientes en actividad proteasa, unidas a la existencia de métodos de transformación, convierten a este hongo en una alternativa a los organismos ya utilizados para la producción a gran escala de proteínas de mamíferos. Una prueba de ello es la eficiente expresión de la quimiosina de ternera en *Trichoderma* (Harkki *et al.*, 1987).

Sin embargo, la importancia del género *Trichoderma* estriba sobre todo en su capacidad de limitar el crecimiento y la propagación de muchos hongos patógenos de plantas, fenómeno que se denomina control biológico o biocontrol. Los agentes de control biológico se conocen desde hace más de 60 años (Weidling, 1934), y su uso en la lucha contra los hongos fitopatógenos presenta grandes ventajas frente a las técnicas tradicionales.

La utilización de fungicidas químicos tiene graves consecuencias ecológicas, puesto que normalmente destruyen una más o menos amplia gama de microorganismos que incluye al fitopatógeno. Puede, además, repercutir negativamente en la salud de los animales que ingieren las plantas tratadas, incluido el hombre. Además, existe la necesidad de renovar en cada cosecha el pesticida utilizado, y en ocasiones, alternar su uso con otros, puesto que pueden surgir cepas de patógenos resistentes (Cornelissen *et al.*, 1993). Esto tiene serias repercusiones económicas: sólo en Europa, el coste del tratamiento del trigo con pesticidas se ha estimado en más de 80 millones de ECUs anuales (Lamb *et al.*, 1992). Los países en vías de desarrollo o subdesarrollados, más necesitados, además, de una agricultura sostenible, son los principales perjudicados en este sentido.

Frente a este control tradicional de las enfermedades producidas por hongos en las plantas, el control biológico parece reunir todas las ventajas. En líneas generales, el biocontrol altera el ambiente que rodea un cultivo para favorecer a los organismos que contribuyen a su salud y vigor (Cook y Baker, 1983). Por otra parte, el agente de control biológico es capaz de impedir el crecimiento y desarrollo de los organismos patógenos, fenómeno denominado antagonismo, y que es de vital importancia en el proceso global de biocontrol.

En muchas ocasiones, el agente de control biológico es capaz de crecer y colonizar partes de la planta como el sistema radicular, protegiéndolo de los fitopatógenos. Además, a veces, el agente de biocontrol favorece el crecimiento de la planta, obteniéndose mayores rendimientos además de la ventaja que supone el control directo de la enfermedad. Por otra parte, la localización restringida del agente de biocontrol alrededor de la raíz minimiza la presión de selección que favorecería la aparición de especies de fitopatógenos resistentes (Handelsmann y Stabb, 1996).

Varias especies de *Trichoderma* han sido descritas como antagonistas de una amplia variedad de hongos fitopatógenos (Papavizas, 1985). Ya Weindling, en 1932, sugirió que se podría controlar una serie de hongos patógenos por adición al suelo de inóculos de este hongo. De hecho, *Trichoderma* presenta una serie de características muy ventajosas para su utilización como agente de control biológico (revisado por Jeffries y Young, 1993). En primer lugar, presenta un efecto antagónico contra una gran variedad de hongos patógenos de plantas. Además, crece muy rápidamente, necesita pocos nutrientes para su desarrollo, y es capaz de vivir en suelos ácidos y básicos. Tras fumigar un suelo, *Trichoderma* se recupera rápidamente y recoloniza el suelo tratado. Produce abundantes esporas, y necesita pocos requerimientos para germinar. Por otra parte, *Trichoderma* favorece la formación y el desarrollo de las micorrizas, y estimula directamente el crecimiento de las plantas en ausencia de hongos patógenos, produciendo o estimulando la producción de fitohormonas. De hecho, se ha utilizado como suplemento en una variada gama de cultivos hortícolas (Baker, 1989).

Las especies del género *Trichoderma*, y la especie afín *Gliocladium virens* (recientemente reclasificada como *Trichoderma virens*) han sido utilizadas en numerosas ocasiones como agentes efectivos de control biológico. En la tabla 1 se muestran los diversos hongos fitopatógenos que han sido controlados por estas especies.



Especie de <i>Trichoderma</i>	Planta tratada	Patógeno combatido
<i>T. hamatum</i>	trigo y grama narciso varias plantas algodón, leguminosas, patatas, remolacha, rábano	"take-all" <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>R. solani</i>
<i>T. harzianum</i>	remolacha, tomate, judía, girasol ajo lechuga  patata narciso, tomate, algodón, melón, patata lechuga, algodón, judía, patatas, remolacha, rábano, zanahoria, tabaco tomate frutales	<i>Sclerotium rolfsii</i>  <i>Sclerotium cepivorum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Sclerotinia minor</i> <i>Sclerotinia sclerotium</i> <i>Phytophthora spp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i>  <i>R. solani</i>  <i>Verticilium spp.</i> <i>Armillaria mellea</i>
<i>T. koningii</i>	trigo y grama leguminosas	"take-all" <i>R. solani</i>
<i>T. polysporum</i>		<i>Fomes annosus</i>
<i>T. reesei</i>		varios patógenos
<i>T. viride</i>	judía lechuga narciso algodón, tomate, leguminosas, patatas, remolacha patata	<i>Penicillium digitatum</i> <i>S. rolfsii</i> <i>P. ultimum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i>  <i>Verticilium spp.</i>
<i>Trichoderma</i> spp.	tomate	<i>S. rolfsii</i> <i>Fusarium solani</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. oxysporum</i>
<i>Gliocladium virens</i> ( <i>T. virens</i> )	judía  patata manzano	<i>S. rolfsii</i>  <i>R. solani</i> <i>Phytophthora spp.</i> <i>root rot</i>

**Tabla 1. Hongos fitopatógenos controlados por diferentes especies de *Trichoderma*** (modificado de Rice, 1995 y de De la Cruz, 1994).

## 1.2. Antagonismo y micoparasitismo.

El antagonismo natural de *Trichoderma* frente a otros hongos es el resultado de varios procesos de distinta naturaleza: competición, antibiosis y micoparasitismo (Papavizas, 1985). Si bien la importancia relativa de estos mecanismos no está clara, y parece que depende de la pareja antagonista-víctima elegida, es posible que los tres actúen de forma secuencial, combinada, o bien sinérgica.

### 1.2.1. Competición.

La supresión de patógenos por *Trichoderma* se ha atribuido en ocasiones a la monopolización de los nutrientes de la rizosfera por el antagonista, en detrimento de la nutrición del hongo parasitado (Sivan y Chet 1989). Entre los nutrientes más limitantes se encuentra el hierro, cuya baja concentración en el suelo en forma soluble (menos de  $10^{-18}$  M a pH neutro) origina una verdadera lucha por su obtención (Handelsmann y Stabb, 1996). Se ha descrito la producción de sideróforos por parte de *Trichoderma*, del tipo de los de las bacterias del género *Pseudomonas*. Los sideróforos consisten en un ligando con alta afinidad para el hierro y una proteína de transporte al interior de la célula, y su presencia ha sido asociada en algunas especies de *Pseudomonas* con su capacidad de ejercer control biológico (Duijff *et al.*, 1994; Buysens *et al.*, 1996). Sin embargo, en las especies de *Trichoderma* analizadas no se ha encontrado una buena correlación entre la actividad antagonista y la producción de sideróforos.

El nutriente más abundante de la rizosfera es la celulosa. Se ha sugerido que un eficaz aprovechamiento de este polímero podría favorecer el establecimiento de las especies de *Trichoderma* en la rizosfera. Al analizar unos mutantes de *T. harzianum*, Ahmad y Baker (1987) encuentran una relación positiva entre la actividad celulasa y la capacidad de colonizar la rizosfera. Sin embargo, Köhl y Schlösser (1990) determinan la capacidad antagonista frente a *Rhizoctonia solani* y la actividad celulolítica de diferentes estirpes de *Trichoderma* spp. Los resultados muestran que no existe correlación entre las dos características analizadas.

La competición por el espacio parece ser otro mecanismo que podría explicar el antagonismo ejercido por *Trichoderma* en algunos casos. *Trichoderma* es un hongo muy versátil, austero en sus requerimientos nutricionales, y capaz de producir gran cantidad de esporas en lapsos cortos de tiempo: es, en definitiva, un buen colonizador. El establecimiento de *Trichoderma* en los capuchones florales de las vides protege a los racimos de uvas de la infección por *Botrytis cinerea*, puesto que sus hifas no son capaces de instalarse en el espacio ocupado por el antagonista (Davet, 1990).

### 1.2.2. Antibiosis.

En numerosos sistemas de biocontrol estudiados, la supresión de la enfermedad ha sido atribuida a la producción de uno o varios antibióticos, volátiles o no, por parte del antagonista (revisado por Handelsman y Stabb, 1996). Algunas especies de *Trichoderma*, sobre todo *T. (G.) virens*, producen antibióticos; entre ellos, cabe citar la gliotoxina, la viridina, la diketopiperazina gliovirina, el sesquiterpenoide trichodermina, y los antibióticos peptídicos alemeticina y suzukamicina (Papavizas, 1985; Lumsden *et al.*, 1992). Muchos de ellos han demostrado su actividad antifúngica *in vitro* (Howell, 1987, Lewis *et al.*, 1989). La producción de los antibióticos no parece ser un fenómeno propio del cultivo de los hongos en el laboratorio, sino que se han encontrado también en el suelo, asociados a fenómenos de control biológico, de tal forma que las cepas de *G. virens* con mayor capacidad de producción de antibióticos son capaces de controlar de forma más efectiva los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (Lumsden *et al.*, 1992). Recíprocamente, mutantes de *G. virens* que no producen gliotoxina ven mermada su capacidad de controlar las enfermedades producidas por *Phyium* (Wilhite *et al.*, 1994).

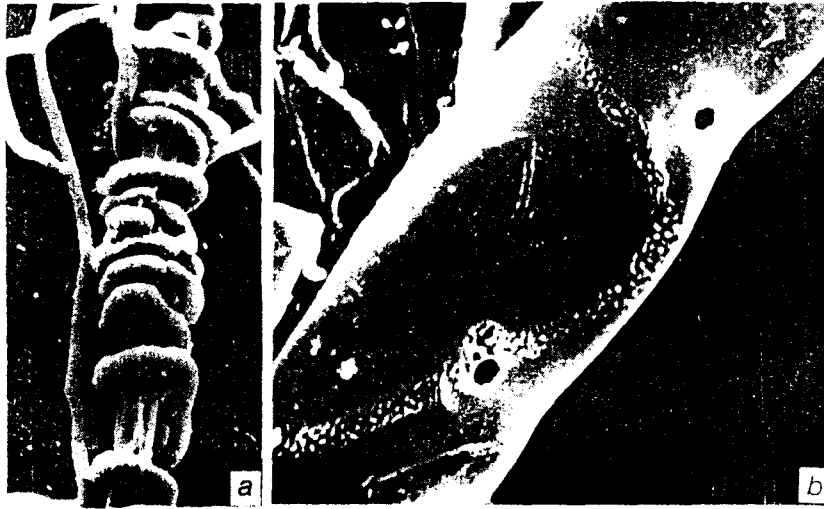
### 1.2.3. Micoparasitismo.

El micoparasitismo es una asociación de dos hongos, en la que uno de ellos ataca al otro y le extrae sus nutrientes, en parte o en su totalidad, sin ofrecer ningún beneficio a cambio. El término hiperparasitismo se aplica al fenómeno mediante el cual un organismo ataca a otro que es, a su vez, parásito o patógeno.

Los micoparásitos pueden ser biótrofos, es decir, que obtienen los nutrientes de los organismos parasitados sin matarlos, o necrótrofos, es decir, que matan a sus víctimas antes o durante la invasión de sus células. Estos últimos son de amplio espectro, y su modo de acción es poco especializado, mientras que los micoparásitos biótrofos suelen ser muy específicos, y normalmente presentan estructuras especializadas a través de las cuales absorben los nutrientes (Lewis *et al.*, 1989).

El género *Trichoderma* incluye especies hiperparásitas, especialmente *T. harzianum* y *T. viride*, con características intermedias entre los micoparásitos biótrofos y los necrótrofos, pues, si bien matan a los hongos que parasitan, también forman estructuras especializadas que les permiten establecer el contacto y la penetración.

El micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* incluye una serie de etapas sucesivas. En primer lugar, las hifas del patógeno son reconocidas a distancia por el micoparásito, y, aunque no se conoce el mecanismo bioquímico responsable de este fenómeno, se piensa que *Trichoderma* detecta un gradiente químico con origen en el hospedador. A continuación, el patógeno es reconocido por el parásito. Las hifas de ambos hongos crecen paralelas sin establecer contactos (Dennis y Webster, 1971). La identificación de las características de la superficie del patógeno se lleva a cabo a través de interacciones entre las lectinas del hongo atacado y residuos de azúcares de la pared celular de *Trichoderma*. De hecho, *Trichoderma* no es capaz de establecer la interacción micoparásita con fibras de nylon de idéntico diámetro que el hongo *Phythium ultimum* (Dennis y Webster, 1971), frecuentemente parasitado por *Trichoderma*, salvo que éstas hayan sido previamente tratadas con la lectina vegetal concanavalina A o con una lectina aislada de *Sclerotium rolfsii* (Inbar y Chet, 1992). Tras el reconocimiento del patógeno, *Trichoderma* se enrolla alrededor de sus hifas mediante unas estructuras especializadas que reciben el nombre de apresorios u horquillas. Este fenómeno se puede visualizar con ayuda de la microscopía óptica y electrónica de barrido (Elad *et al.*, 1983). La última etapa es la penetración del antagonista en el interior del micelio del hospedador. Se han propuesto dos mecanismos que actuarían sinérgicamente para permitir la invasión intracelular: una acción mecánica en los sitios de interacción (Goldman, 1993), y una bien establecida lisis enzimática de las paredes del patógeno en las zonas de contacto (revisado en Haran *et al.*, 1996; Elad *et al.*, 1982; Ridout *et al.*, 1988; Sivan y Chet, 1989). La microfotografía de la figura 1 presenta la visualización al microscopio electrónico de barrido de las zonas de penetración tras eliminar las hifas de *Trichoderma*. Se pueden apreciar claramente zonas de lisis enzimática en las hifas del patógeno (Elad *et al.*, 1983b). Una vez ha accedido al espacio intercelular de la víctima, el micoparásito digiere su contenido, tras lo cual, en muchas ocasiones, esporula (Elad *et al.*, 1984).



**Figura 1. (A).** Enrollamiento y penetración de *T. hamatum* sobre hifas de *R. solani*. **(B).** Hifa de *R. solani* tras eliminar las del micoparásito. Las zonas de lisis se tiñen específicamente con calcoflúor, que se une a los extremos de oligómeros que resultan de la degradación enzimática de los polímeros de la pared celular, fundamentalmente quitina.

Si bien la competencia y la antibiosis revisten cierta importancia en el proceso general de antagonismo ejercido por el género *Trichoderma*, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento coinciden en atribuir al micoparasitismo, y en concreto, a la producción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los hongos parasitados, el papel principal en este complejo sistema. Al analizar las actividades quitinasa y glucanasa de diferentes cepas de *T. harzianum* cuando son enfrentadas a diversos hongos fitopatógenos, se observa que la actividad hidrolítica de cada cepa es diferente y varía según la víctima. En cualquier caso, los datos demuestran que la producción en cada caso de enzimas hidrolíticas está correlacionada con la aptitud de cada cepa de *Trichoderma* de controlar al patógeno respectivo (Elad *et al.*, 1982, Ridout *et al.*, 1986, Chet, 1990). En cambio, unos mutantes no micoparásitos de *G. virens* mantienen la capacidad antagonista (Howell, 1987).

En resumen, se ha sugerido en numerosas ocasiones que el micoparasitismo constituye el principal mecanismo de biocontrol ejercido por *Trichoderma*, aunque su contribución a la supresión de los fitopatógenos no está completamente aclarada, y parece depender del dúo antagonista-patógeno en estudio. En general, y a tenor de los datos de los diferentes grupos, la producción de antibióticos parece revestir más importancia en el caso de las diferentes cepas de *G. (T.) virens* analizadas, mientras que las especies de *Trichoderma* suelen ejercer el control biológico a través del micoparasitismo, dentro del cual la excreción de enzimas hidrolíticas (especialmente quitinasas y glucanasas) juega un importante papel. El análisis de mutantes deficientes en dichas hidrolasas o de transformantes en los cuales la expresión de los genes que las codifican esté anulada, ayudará a determinar la importancia de las hidrolasas en el proceso micoparasitario.

### **1.3. Enzimas hidrolíticas asociadas al proceso micoparasitario.**

Como se ha explicado anteriormente, el mecanismo más aceptado de penetración a través de la pared celular del patógeno en el proceso micoparasitario es la excreción de enzimas hidrolíticas que la degradan. A continuación, las hifas de *Trichoderma* se introducen en el interior del hospedador y degradan su contenido celular.

#### **1.3.1. La pared celular de los hongos.**

La pared celular es una estructura dinámica y muy organizada. Sirve de barrera mecánica y química con el exterior, es responsable de la forma celular, permite la integridad osmótica, actúa como filtro para la secreción e incorporación de sustancias, y constituye una rica reserva de carbono. Por otra parte, permite a los hongos generar turgor, que, junto con las enzimas que degradan paredes, contribuye a la penetración de las hifas en sustratos orgánicos (ver apartado 2.1. de esta *Introducción*; Wessels, 1984).

La pared celular fúngica está compuesta básicamente de carbohidratos, que constituyen entre un 80 y un 90% de su peso seco. Proteínas, lípidos, pigmentos (melanina) y sales minerales constituyen el 10-20% restante. El estado de agregación de los componentes de la pared celular de los hongos define dos tipos de estructuras en la misma: una fibrilar, en la cual las cadenas de polisacáridos que lo forman se enlazan formando fibras, y otra matricial, en la cual otros polisacáridos más solubles en agua actúan como matriz cementante e impiden la compresión de la pared celular (Wessels, 1994). Normalmente, los componentes fibrilares se encuentran en las capas más interiores de la pared, mientras que los matriciales se sitúan en las capas exteriores (Peberdy, 1990).

La celulosa, homopolímero fibrilar de moléculas de glucosa unidas con enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, es el componente mayoritario de las paredes celulares de los oomicetos, y la quitina, homopolímero fibrilar de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) con enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, es el componente principal de las paredes de los demás grupos de hongos (quitidriomicetos, zigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos). El tercer polisacárido fibrilar fundamental es el  $\beta$ -glucano, polisacárido de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,3-glucosídicos y con ramificaciones de glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,6-glucosídicos.

Los polisacáridos de la estructura matricial son el quitosán (forma desacetilada de la quitina), los galactanos y los  $\alpha$ -glucanos, de los cuales, el  $\alpha$ -1,3-glucano o pseudonigerán, es el más frecuente, y a veces alterna con  $\alpha$ -1,4-glucanos (nigerán). Las manoproteínas, glucoproteínas con alto contenido en manosa, son también abundantes en la matriz de las paredes de algunos grupos de hongos.

En cuanto a las proteínas de la pared, además de las ya citadas manoproteínas que tienen un papel estructural, existen proteínas con actividad enzimática asociadas a los componentes matriciales. Son fundamentalmente hidrolasas (fosfatasa ácida, amilasas, proteasas y  $\beta$ -glucosidasas, entre otras) que permiten la conversión de sus sustratos en sustancias fácilmente asimilables (Peberdy *et al.*, 1990). Las hidrofobinas

a la pared celular fúngica y se expresan abundantemente durante ciertas etapas del desarrollo, especialmente durante la formación de estructuras aéreas. Este grupo de proteínas ha recibido recientemente mucha atención, pues parece que juega papeles importantes en la dispersión de las esporas, la adhesión a las superficies hidrófobas de plantas e insectos, e incluso en el crecimiento del hongo en la planta y la formación de haustorios (revisado por Wessels, 1994).

La biogénesis de la pared celular está relacionada con la morfogénesis fúngica. Durante el tránsito de las formas levaduriformes a las fungiformes que sufren los hongos dimórficos, el patrón estructural y la composición de la pared celular se alteran. La importancia de este hecho se pone de manifiesto en *Candida albicans*, puesto que solamente la forma levaduriforme es patógena, siendo inocua la forma fungiforme.

Los hongos filamentosos crecen apicalmente, gracias a la acción secuencial y equilibrada de enzimas de degradación y de síntesis de los componentes de la pared. En primer lugar, la hidrólisis de los polímeros de la pared permite a las sintetasas la incorporación de más monómeros en los extremos que producen, con el consiguiente alargamiento (revisado por Sentandreu *et al.*, 1994, y por Sietsma y Wessels, 1994)

Puesto que los polisacáridos más abundantes en la paredes celulares de los hongos filamentosos, salvo de los oomicetos, son la quitina y los  $\beta$ -glucanos, las enzimas más importantes en el proceso micoparasitario serán las encargadas de su hidrólisis, es decir, las quitinasas y las  $\beta$ -glucanasas.

### **1.3.2. Enzimas hidrolíticas de polímeros de la pared celular de hongos.**

Las especies de *Trichoderma* secretan una serie de enzimas hidrolíticas que le permiten degradar los componentes de la pared celular de los hongos a los que parasita. *T. reesei* ha sido reconocido como uno de los microorganismos con mayor poder celulolítico (revisado en Nevalainen *et al.*, 1991), y produce endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4), exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasas (BGL, EC 3.2.1.21), para degradar secuencial y sinérgicamente la celulosa hasta producir, en primer lugar, celobiosa y oligosacáridos cortos solubles, y, más adelante, los monómeros de glucosa. Sin embargo, la degradación de la celulosa no tiene un papel relevante en el proceso del micoparasitismo, y, aunque las enzimas y los genes correspondientes han sido estudiado en detalle, así como su regulación, este trabajo se centrará en el estudio de las actividades enzimáticas que guardan una relación directa con el micoparasitismo, es decir, quitinasas, glucanasas ( $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6 glucanasas) y proteasas.

En cuanto a las proteasas, se ha encontrado que el pretratamiento de paredes de *Fusarium oxysporum* con proteasas favorece la posterior lisis de las mismas con glucanasas y quitinasas, y se ha sugerido que la resistencia a la lisis por enzimas hidrolíticas exhibida por las paredes de *Fusarium* podría deberse a la existencia de un componente proteico en las mismas (Sivan y Chet, 1989). Ridout *et al.* (1988) encuentran actividad proteasa en cultivos de *T. harzianum* que contenían paredes de *R. solani* como fuente de carbono. Posteriormente, se ha clonado el gen de una proteasa alcalina de *T. harzianum*, *prb1*, y se ha comprobado su inducción en condiciones de micoparasitismo simulado (cultivos del hongo en quitina, paredes de hongos o micelios

micoparasitismo simulado (cultivos del hongo en quitina, paredes de hongos o micelios autoclavados como única fuente de carbono), y en las zonas de interacción entre *R. solani* y *T. harzianum* cuando ambos hongos se enfrentan en cultivos duales en placas (Geremia *et al.*, 1993).

### 1.3.2.1. Las $\beta$ -glucanasas.

Se han encontrado  $\beta$ -1,3-glucanasas en numerosos organismos, desde bacterias hasta hongos, algas, plantas superiores y moluscos (Pitson *et al.*, 1993). Existen dos tipos de  $\beta$ -1,3-glucanasas (1,3- $\beta$ -glucosidasas), dependiendo de su mecanismo de acción: las endo- $\beta$ -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39), que actúan en el interior de las moléculas, liberando oligosacáridos más cortos, y las exo- $\beta$ -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.58), que liberan el monómero, glucosa, a partir del extremo no reductor del polímero.

Las funciones de las  $\beta$ -1,3-glucanasas son diversas, dependiendo de su origen. Las bacterias carecen de glucanos en su pared celular; por consiguiente, el papel de las glucanasas en estos organismos podría ser nutricional, asociado a la capacidad de lisar paredes de hongos filamentosos y levaduras, estas últimas muy ricas en  $\beta$ -1,3-glucanos (Andrews y Asenjo, 1987). Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de levaduras, a su vez, poseen un papel morfogénico fundamental, y participan en los procesos de hidrólisis controlada de la pared celular asociados a la gemación, la expansión celular y la esporulación (Muthukumar *et al.*, 1993).

La función de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas es fundamentalmente defensiva ante los ataques de microorganismos (Mauch *et al.*, 1988). Esta enzima posee también papeles endógenos en las plantas, puesto que, en primer lugar, éstas contienen calosa, un  $\beta$ -glucano que forma deposiciones transitorias en las paredes celulares de zonas agredidas. Además, se ha sugerido que su acción es requerida en una serie de procesos morfogénicos (Fincher, 1989). La función y regulación de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de las plantas será analizada en el apartado 3.1. de esta Introducción.

En los hongos filamentosos, se han sugerido varias funciones para las  $\beta$ -1,3-glucanasas. En primer lugar, poseen un papel morfogénico, similar al ya descrito para las levaduras, durante el crecimiento y la diferenciación celular (Peberdy, 1990). Un segundo papel es el nutricional, asociado a procesos autolíticos originados por carencia de carbono, en el cual los hongos movilizan la glucosa contenida en sus paredes, mayoritariamente en forma de  $\beta$ -1,3-glucanos (Rapp, 1992). En hongos saprófitos y micoparásitos, las  $\beta$ -1,3-glucanasas participan en la hidrólisis de los componentes de las paredes de los hongos que constituyen su alimento (Papavizas, 1985; Ridout *et al.*, 1988). Además, los hongos patógenos de plantas podrían utilizar las  $\beta$ -1,3-glucanasas para degradar la calosa que se deposita en las paredes celulares vegetales cuando se producen agresiones.

*T. harzianum* secreta una serie de  $\beta$ -1,3-glucanasas cuya implicación en el proceso micoparasitario ha sido ampliamente aceptada (Ridout *et al.*, 1988). Recientemente, se ha comprobado la actividad antifúngica *in vitro* de una  $\beta$ -1,3-glucanasa de *T. harzianum* P1, capaz de inhibir la germinación y la elongación de *Botrytis cinerea* (Lorito *et al.*, 1994).

Además de las  $\beta$ -1,3-glucanasas, existen otras glucanasas que degradan enlaces menos abundantes en las paredes celulares fúngicas. En *T. harzianum* CECT 2413 se han encontrado dos  $\beta$ -1,6-glucanasas, capaces de inhibir la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* y *Gibberella fujikuroi* (De la Cruz *et al.*, 1995). Aunque los enlaces  $\beta$ -1,6-glucosídicos son minoritarios en las paredes celulares, su hidrólisis podría facilitar la de otros componentes de la pared celular, como lo sugiere el efecto sinérgico que presentan estas proteínas con otras hidrolasas (quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas) aisladas de *T. harzianum* CECT 2413 (De la Cruz *et al.*, 1995).

En la tabla 2 se muestra un resumen de las  $\beta$ -glucanasas de *T. harzianum* que se han aislado y caracterizado, así como de la regulación de los genes que las codifican.

Estirpe	Tipo de glucanasa	Peso molecular aparente	Regulación de la actividad	Regulación del gen	Referencia
TMI 60622	Exo- $\beta$ -1,3	31 kDa	N.D.	N.D.	Kitamoto <i>et al.</i> , 1987
N.D.	Exo- $\beta$ -1,3	40 kDa	N.D.	N.D.	Dubourdieu <i>et al.</i> , 1985
P1	Endo- $\beta$ -1,3	78 kDa	N.D.	N.D.	Lorito <i>et al.</i> , 1994
CECT 2413	Endo- $\beta$ -1,3	81 kDa	Nivel basal en Glc; inducible por quitina y polímeros de Glc, y por micoparasitismo simulado .	Inducible por quitina, laminarina y micoparasitismo simulado	De la Cruz <i>et al.</i> , 1995 b
CECT 2413	Endo- $\beta$ -1,6	66 kDa	Nivel basal en Glc; inducible por quitina y polímeros de Glc, y por micoparasitismo simulado .	N.D.	De la Cruz <i>et al.</i> , 1995 a
CECT 2413	Endo $\beta$ -1,6	43 kDa	idem	Desreprimido por hambre de glucosa	De la Cruz <i>et al.</i> , 1994; Lora <i>et al.</i> , 1995

**Tabla 2.  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanasas de *T. harzianum*.**



### 1.3.2.2. Las quitinasas.

La quitina es el segundo compuesto más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. No es de extrañar, pues, su ubicuidad en los seres vivos. Está presente en bacterias, levaduras, hongos filamentosos, protozoos, nematodos, plantas, celentéreos, moluscos y artrópodos (Jeuniaux, 1966).

Las degradación de la quitina tiene lugar en una serie de etapas consecutivas y sinérgicas, con la actuación de varios tipos de enzimas hidrolíticas. Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14) hidrolizan enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos del interior de la molécula de quitina, liberando oligosacáridos cortos; las exoquitinasas (EC 3.2.1.14) actúan sobre el mismo enlace, pero liberan el dímero de GlcNAc (la quitobiosa) desde el extremo no reductor de la molécula; la quitobiosa y los oligosacáridos pequeños de GlcNAc son convertidos en monómeros gracias a la acción de las 1,4- $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasas (EC 3.2.1.30) (Sahai y Manocha, 1993). Algunas quitinasas son también capaces de degradar la lisozima, es decir, que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos entre residuos de ácido N-acetil-murámico y GlcNAc que constituyen el peptidoglucano de las paredes de las bacterias (Roberts y Selitrennikoff, 1988). Recíprocamente, algunas lisozimas de plantas tienen también actividad quitinasa (Bernasconi *et al.*, 1987).

Las funciones de las quitinasas son diversas. Las bacterias, que no contienen quitina, utilizan la quitina como fuente de carbono y, potencialmente, de nitrógeno (Jones *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1992; Robbins *et al.*, 1992). Las levaduras sólo contienen quitina en una zona determinada de la unión entre la célula madre y la yema hija, el anillo de gemación, que, al constreñirse, permite la separación de las dos células. Las quitinasas de levaduras son, por consiguiente, morfogénicas, y se ha comprobado que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que carecen de quitinasa no son capaces de dividirse correctamente, y forman racimos de células que no pueden separarse (Kuranda y Robbins, 1991).

Las quitinasas de los artrópodos son esencialmente morfogénicas, y se inducen por la hormona de muda ecdisona, que activa el proceso mediante el cual el organismo crece (Cabib, 1987). También se han encontrado en las mucosas digestivas de anfibios, reptiles, peces, aves y mamíferos (Jeuniaux, 1966). También se ha encontrado una quitinasa humana.

Las quitinasas de plantas tienen una función de defensa ante los ataques por fitopatógenos, aunque más recientemente se ha sugerido un papel morfogénico (Collinge *et al.*, 1993). La presencia, función y regulación de las quitinasas de plantas será analizada más adelante (ver apartado 3.2. de esta *Introducción*).

En los hongos filamentosos, las quitinasas poseen una doble función. La primera, presente en los hongos que contienen quitina, es morfogénica, siendo esencial para el crecimiento del micelio y la diferenciación de estructuras especializadas, como son las esporas y los cuerpos fructíferos. La segunda función es nutricional, para el aprovechamiento de la quitina por parte de los hongos saprófitos, o eventualmente, para producir orificios en las paredes de los hongos micoparasitados (Gooday *et al.*, 1985).

En este sentido, se ha invertido mucho esfuerzo en dilucidar el sistema quitinolítico de *T. harzianum*, que, junto con el sistema glucanolítico, se ha propuesto como el sistema directamente responsable de la actividad micoparasitaria (revisado en Haran *et al.*, 1996). Se han aislado siete quitinasas extracelulares de *T. harzianum*, cuyo tipo de acción y características se resumen en la tabla 3.

Designación	Peso molecular aparente	Actividad	Estirpe	Referencias
CHIT 102	118-102 kDa	NAG	TM	Haran <i>et al.</i> , 1995
			39.1	Ulhoa y Peberdy, 1991
CHIT73	73 kDa	NAG	TM	Haran <i>et al.</i> , 1995
			P1	Lorito <i>et al.</i> , 1994
CHIT52	52 kDa	Endo	TM	Haran <i>et al.</i> , 1995
CHIT42-	42 kDa	Endo	CECT24	De la Cruz <i>et al.</i> , 1992
ECH42			13	Ulhoa y Peberdy, 1992
			39.1	Harman <i>et al.</i> , 1993
			P1	
CHIT40	40kDa	Exo	P1	Harman <i>et al.</i> , 1993
CHIT37	37-33 kDa	Endo	CECT24	De la Cruz <i>et al.</i> , 1992
			13	Haran <i>et al.</i> , 1995
			TM	
CHIT33	33-31	Endo	CECT24	De la Cruz <i>et al.</i> , 1992
			13	Haran <i>et al.</i> , 1995
			TM	

**Tabla 3. Actividades quitinolíticas de *T. harzianum*** (modificado de Haran *et al.*, 1996). NAG: N-acetil-glucosaminidasa; Endo: endoquitinasa; Exo: exoquitinasa.

En cuanto a su regulación, estas quitinasas, al igual que las bacterianas y las que se han aislado de otros hongos, presentan inducción por quitina y represión por glucosa (Joshi *et al.*, 1987; Blaiseau y Lafay, 1992, De la Cruz *et al.*, 1993; Haran *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1996). La naturaleza del inductor es desconocida. La quitina es una macromolécula demasiado grande para ser considerada el inductor molecular, y se ha sugerido que tal papel podría ser desempeñado por la quitobiosa u oligómeros pequeños de GlcNAc (Cabib *et al.*, 1987). En los casos en los que se ha estudiado, la actividad quitinasa se induce, además, en condiciones de micoparasitismo simulado (cultivos en paredes o en micelios de hongos autoclavados, De la Cruz *et al.*, 1993, 1994). Es interesante destacar el paralelismo que existe entre los patrones de expresión que presentan las enzimas quitinolíticas y las  $\beta$ -glucanasas. Este hecho sugiere la existencia de mecanismos comunes de regulación para las proteínas relacionadas con el micoparasitismo. Puesto que los sustratos para los dos tipos de enzimas aparecen a menudo asociados en la naturaleza (por ejemplo, en las paredes celulares de los hongos), una inducción coordinada de ambas actividades podría revestir gran importancia biológica (Lorito *et al.*, 1993).

La actividad antifúngica *in vitro* de algunas de estas quitinasas ha sido demostrada. Dos enzimas quitinolíticas, una endoquitinasa y una exoquitinasa aisladas de *T. harzianum* P1, son capaces, solas o combinadas, de inhibir la germinación e impedir la elongación del tubo germinal de *Botrytis cinerea*, *Ustilago avenae*, *Uncinula necator* y *Fusarium solani* (Lorito *et al.*, 1993).

#### 1.4. Efecto sinérgico de las quitinasas de *Trichoderma* con otras hidrolasas y otros compuestos antimicrobianos.

Como se ha visto, la actividad antifúngica de algunas hidrolasas aisladas de *T. harzianum* ha sido demostrada. Anteriormente se ha sugerido la posibilidad de estudiar el efecto antifúngico de diversas combinaciones de enzimas. En el mismo estudio referido en el apartado anterior, Lorito *et al.*, 1993, encuentran que la combinación de las actividades endo- y exoquitinasas incrementan de forma sinérgica la actividad antifúngica de las proteínas. Mezclas de dichas quitinasas con una  $\beta$ -glucanasa y/o una  $\beta$ -glucosaminidasa, aisladas de *T. harzianum* P1, aumentan sinérgicamente *in vitro* la actividad antifúngica de cada cual por separado, observándose la mayor inhibición de la germinación y la elongación del tubo germinal de *B. cinerea* al combinar adecuadamente las cuatro proteínas (Lorito *et al.*, 1994).

Asimismo, De la Cruz *et al.* (1995a), encuentran un efecto cooperativo en la inhibición del crecimiento de los hongos *B. cinerea* y *Gibberella fujikuroi* ejercida por las  $\beta$ -1,6-glucanasas I y II en combinación con las tres quitinasas CHIT42, CHIT37 y CHIT33, aisladas de *T. harzianum* CECT 2413. La máxima capacidad hidrolítica frente a paredes de hongos, compleja estructura en la cual unos compuestos rodean y enmascaran a otros, podría requerir combinaciones de enzimas con modos de acción complementarios, cuya acción individual permitiría el acceso de las otras enzimas a su sustrato. De este modo, una correcta combinación de dichas enzimas podría incrementar la actividad antifúngica, y acercarla a la exhibida por los pesticidas químicos (Lorito *et al.*, 1993).

Las quitinasas aisladas de *Trichoderma* y la especie *Gliocladium (T.) virens* actúan sinérgicamente también con otros compuestos antimicrobianos. Schirmböck *et al.* (1994) han observado una síntesis coordinada de enzimas hidrolíticas y antibióticos en la estirpe de *T. harzianum* ATCC 36042. Además, el efecto sinérgico que presentan frente a la germinación y la elongación de los tubos germinales de *B. cinerea* se hacen patentes al analizar el efecto inhibitorio de cada elemento por separado, mucho menor que el exhibido por la combinación de los mismos, que es, a su vez, del mismo rango que el máximo mostrado por los sobrenadantes de los cultivos inducidos. Al combinar la endo- y la exoquitinasa de *T. harzianum* P1 con una estirpe de la bacteria *Enterobacter cloacae* capaz de ejercer control biológico frente a hongos, se observa un marcado efecto cooperativo en la reducción de la germinación y el crecimiento de los hongos filamentosos ensayados (Lorito *et al.*, 1993x). Este mismo efecto sinérgico se observa al combinar fungicidas comerciales contra *B. cinerea* con alguna de las enzimas glucano o quitinolíticas de *T. harzianum* P1 (Lorito *et al.*, 1994).

Lorito *et al.*, 1994, encuentran un fuerte efecto sinérgico entre la endoquitinasa de *G. (T.) virens*, equivalente a la CHIT42 de *T. harzianum*, y el antibiótico gliotoxina, que altera la integridad de las membranas celulares (Jones y Hancock, 1988). La presencia de endoquitinasa permite disminuir la concentración del antibiótico en la mezcla para conseguir una fuerte inhibición del crecimiento y la germinación de *B. cinerea in vitro*.

Se ha observado que los efectos sinérgicos de las enzimas hidrolíticas con otras sustancias antifúngicas son más acusados cuando éstas alteran la integridad de las

membranas celulares (Haran *et al.*, 1996). Se ha sugerido un modelo para explicar este hecho, según el cual la degradación parcial de la pared celular por acción de las enzimas hidrolíticas permitiría la rápida difusión de estos compuestos hacia su sitio de acción en la membrana citoplasmática (Jones y Hamcock, 1988).

Por otra parte, Lorito *et al.* (1996), al ensayar la capacidad antifúngica *in vitro* exhibida por diferentes combinaciones de enzimas hidrolíticas y compuestos que afectan a la integridad de la membrana ("Membrane Affecting Compounds", MACs), encuentran unos niveles variables de sinergia entre ambos tipos de sustancias, así como un drástico descenso en la inhibición de la germinación y el crecimiento de los hongos ensayados al tratarlos secuencialmente con el MAC y la(s) enzima(s) hidrolítica(s). Esto indica que la degradación parcial de algunos componentes de la pared celular es necesaria para la correcta acción de los MACs. La alteración no enzimática de la pared celular de los hongos por adición de L-sorbose en el medio de cultivo presenta también un efecto sinérgico con los MACs.

## **2. LA DEFENSA DE LAS PLANTAS ANTE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS.**

### **2.1. Mecanismos de ataque de los fitopatógenos.**

Los hongos constituyen un grupo de organismos heterotróficos muy versátiles, que han ocupado a lo largo de la evolución la mayoría de los hábitats. Sólo una pequeña proporción (un 10%) es capaz de colonizar las plantas, y sólo una fracción de ellos produce enfermedades. Sin embargo, entre los agentes causantes de enfermedades en los cultivos, los hongos fitopatógenos son los más dañinos, no sólo por provocar epidemias devastadoras, sino también por sus importantes y, sobre todo, persistentes pérdidas en el rendimiento agrícola. Los hongos fitopatógenos son la causa de casi un tercio de los daños en los cultivos, lo cual constituye un serio problema económico, si se tiene además en cuenta que todas las especies conocidas de plantas superiores son infectadas por hongos (Knooge, 1996).

Los hongos han desarrollado estrategias para invadir los tejidos vegetales. Los saprófitos dependen habitualmente de las heridas o las aperturas naturales de las plantas. Sin embargo, la mayoría de los hongos fitopatógenos atraviesan activamente las barreras externas que protegen a las plantas: la cutícula y la pared celular.

Las paredes celulares vegetales presentan una arquitectura compleja, dinámica y altamente organizada, compuesta por una red de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos no celulósicos y glucoproteínas. Aunque la composición y la estructura de la pared vegetal están bastante conservadas, existen algunas diferencias entre los diversos grupos taxonómicos e incluso entre los diferentes tipos celulares.

Los componentes de la pared celular vegetal se resumen a continuación (Azcon Prieto y Talon, 1993).

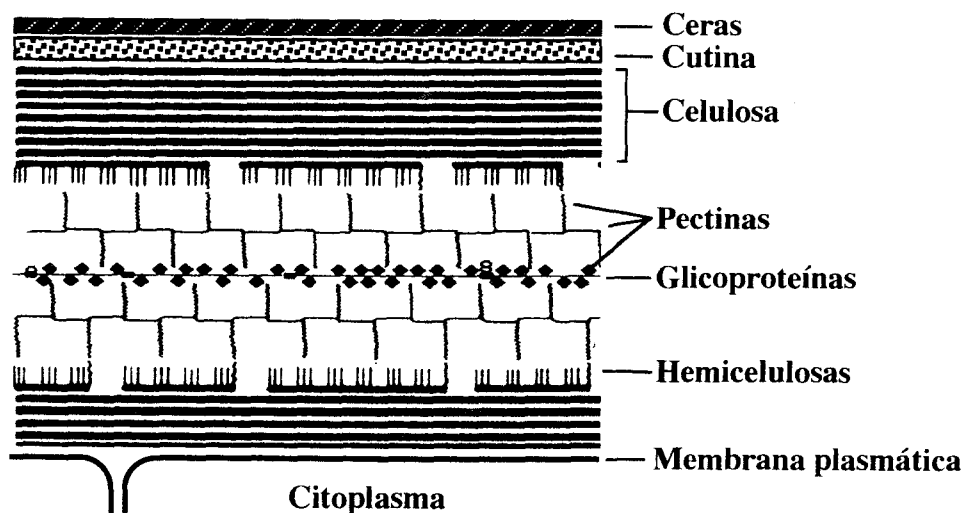
- Celulosa. Es el componente más abundante de la naturaleza. Constituye el componente fibrilar de todas las paredes de las plantas superiores, y está constituida por un polímero lineal de glucosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. Las cadenas del polisacárido se asocian en paralelo formando puentes de hidrógeno, y constituyendo microfibrillas.

- Polisacáridos matriciales. La matriz cementante de la pared vegetal está constituida fundamentalmente por dos tipos de polisacáridos. Los polisacáridos pécticos son una mezcla compleja de galacturonanos y arabinogalactanos, y están presentes en las paredes vegetales en proporciones variables (entre un 5 y un 35%). Las hemicelulosas son polisacáridos neutros que presentan ramificaciones cortas. Los principales polisacáridos hemicelulósicos son el xiloglucano, los  $\beta$ -1,3-1,4-glucanos, los arabinoxilanos, la calosa ( $\beta$ -1,3-glucano) y los mananos. Normalmente se encuentran unidos por puentes de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa.

- Glucoproteínas estructurales. Existe una serie de proteínas estructurales en la pared celular de las plantas que pueden constituir hasta un 10% de su peso seco. Entre ellas, la mejor caracterizada es la extensina, una proteína rica en hidroxiprolina y cuya

parte glucídica contiene principalmente arabinosa y galactosa. Esta glucoproteína forma una red que atrapa las microfibrillas de celulosa y los demás componentes matriciales.

Un esquema de la estructura de la pared celular vegetal se presenta en la figura 2.



**Figura 2. Esquema de la pared celular vegetal** (modificado de Barceló Coll *et al.*, 1987).

### 2.1.1. Mecanismos de penetración de los hongos. Enzimas implicadas.

Al entrar en contacto con una planta hospedadora, los hongos sufren una serie de cambios morfogénéticos y fisiológicos. La naturaleza de los primeros depende de las señales que le proporciona la superficie de las plantas, mientras que los cambios fisiológicos concomitantes al proceso infectivo consisten en un incremento del turgor de la estructura de penetración y en la excreción de una serie de enzimas hidrolíticas (revisado por Mendgen *et al.*, 1996).

Las hifas de los hongos crecen apicalmente gracias a la deposición dirigida por los elementos del citoesqueleto de enzimas hidrolíticas, sintetetasas y monómeros de los polisacáridos de la pared (ver apartado de esta Introducción). Una respuesta tigmotrópica dirige los tubos germinales hacia las superficies vegetales. Los patógenos son capaces, de este modo, de reconocer la topografía de la pared vegetal, o bien las aberturas estomáticas. Si bien se ignoran los mecanismos de reconocimiento, parece ser que en ellos intervienen canales iónicos sensibles a acciones mecánicas (Zhou *et al.*, 1991).

La adhesión de las hifas a la superficie vegetal tiene lugar mediante interacciones hidrofóbicas entre las esporas y la cutícula vegetal. Inicialmente, la adhesión es pasiva, y se debe a elementos estructurales hidrofóbicos o anfipáticos presentes en la superficie de las esporas: proteínas como las hidrofobinas, glicoproteínas y/o carbohidratos. Una segunda etapa, activa, implica la erosión de la cutícula vegetal mediante la acción de

cutinasas y esterases fúngicas, que disminuyen la hidrofobicidad de dicha superficie y contribuyen a la adhesión de las esporas y la iniciación de la infección.

Para el proceso de penetración, algunos hongos desarrollan unas estructuras especializadas, denominadas apresorios, mientras que otros son capaces de atravesar directamente las paredes vegetales. En ambos tipos de hifas se ha observado una degradación de la pared celular asociada al proceso de penetración, así como una acción mecánica que consiste en un aumento de la presión de turgencia de las hifas proporcionado por acumulaciones de melanina en el cono de penetración, y cuya implicación en el proceso infeccioso está suficientemente comprobada (Chumley y Valent, 1990; Mendgen *et al.*, 1996).

En cuanto a las enzimas hidrolíticas que degradan paredes vegetales, se han encontrado en hongos fitopatógenos una serie de enzimas específicas para cada tipo de enlace. La tabla 4 muestra un resumen de todas ellas, así como el polímero vegetal que degradan.

---

**Celulasas**

$\beta$ -1,4-endoglucanasa  
Clobiohidrolasa  
 $\beta$ -glucosidasa

**Pectinasas**

Endopoligalacturonato liasa (Endo PL)  
Exo PL  
Endopoligalacturonasa (Endo PG)  
Exo PG  
Pectín metilesterasa

**$\beta$ -1,4-xilanasa**

**$\beta$ -xilosidasa**

**Cutinasa**

**$\alpha$ -arabinofuranosidasa**

**Arabinasa**

**$\alpha$ -glucosidasa**

**$\beta$ -1,3-glucanasa**

**$\beta$ -1,3- $\beta$ -1,4-glucanasa**

**$\alpha$ -galactosidasa**

**$\beta$ -galactosidasa**

**$\beta$ -1,4-galactanasa**

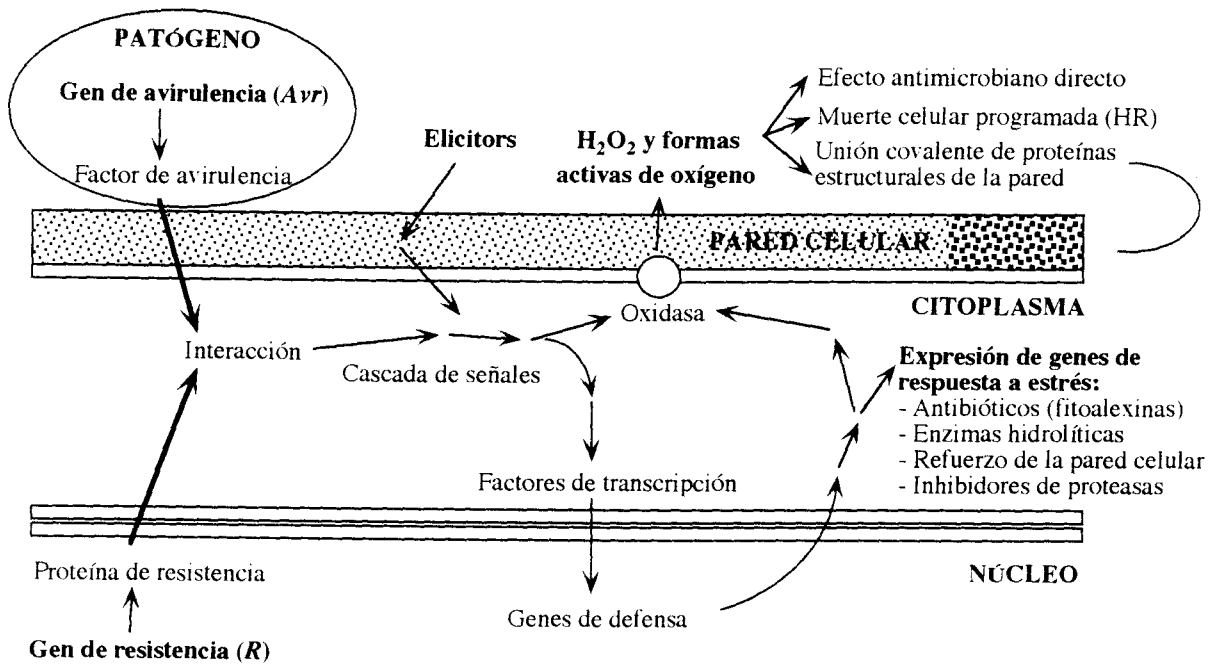
**Proteasa**

**Fosfolipasa**

---

**Tabla 4. Hidrolasas de hongos fitopatógenos** (modificado de Walton, 1994).

## 2.2. Mecanismos de defensa de las plantas.



**Figura 3.** Esquema de los mecanismos de defensa de las plantas (modificado de Lamb, 1984).

### 2.2.1. Reconocimiento. Hipótesis gen a gen.

Las plantas sufren constantemente ataques por hongos fitopatógenos. Las razones por las cuales una enfermedad no se desarrolla son, básicamente, tres (Hammond-Kosack y Jones, 1996):

- a.- La planta no es un huésped, es decir, no constituye un nicho ecológico favorable para el patógeno, y no es capaz de responder a sus requerimientos básicos.
- b.- La planta posee barreras estructurales que impiden la penetración del patógeno, o compuestos tóxicos que le impiden el desarrollo.
- c.- El patógeno es reconocido por la planta, y ésta, inmediatamente, desencadena una serie de mecanismos de defensa para eliminarlo.

Una defensa eficaz de las plantas frente a los patógenos debe contar, en primer lugar, con un mecanismo de vigilancia efectivo. De este modo, el fitopatógeno es localizado en momentos tempranos de la infección, y la planta induce rápidamente los mecanismos de defensa que impiden el desarrollo del organismo atacante y, como consecuencia, la enfermedad se evita. Los patógenos, a su vez, tratan de neutralizar estos mecanismos de detección y/o defensa. Las actuales interacciones planta-patógeno, altamente especializadas, son el resultado de esta compleja dinámica de coevolución.

Las plantas son capaces de detectar la presencia de un patógeno de diversos modos: mediante el contacto físico, el reconocimiento de algún elemento presente en la



superficie de la pared celular del patógeno o la detección de elementos excretados al medio extracelular por el patógeno. Asimismo, una planta es capaz de reconocer la agresión de un patógeno mediante la detección de factores propios, tales como fragmentos de la propia pared celular, que son liberados por la acción de enzimas hidrolíticas del organismo patógeno.

Las moléculas, sean del hospedador o del patógeno, capaces de desencadenar la respuesta general de defensa en las plantas son llamadas elicitores o "*elicitors*". Existen *elicitors* generales, como son los fragmentos que resultan de la hidrólisis parcial de las paredes fúngicas (en concreto, oligoglucanos de diferente longitud y fragmentos de oligoGlcNAc de cuatro o más monómeros; Roby *et al.*, 1987; Felix *et al.*, 1993), enzimas hidrolíticas (Halverston y Stacey, 1986), u oligogalacturonatos procedentes de la pared vegetal (Halverston y Stacey, 1986). Existen, además, otros *elicitors* específicos, cuya acción depende del hospedador (Bailleul *et al.*, 1995). Las elicinas son unos elicitores proteicos de pequeño tamaño secretados por algunos oomicetos, que actúan en ocasiones como determinantes de la resistencia de algunos géneros o cultivares de plantas (revisado por Knooge, 1996).

De este modo, y de forma análoga a la producción y detección de antígenos en mamíferos, algunas de las señales producidas por un patógeno pueden ser detectadas por algunas plantas. Se presume que la resistencia o susceptibilidad de las plantas a un organismo patógeno se define tras este intercambio de señales, que origina en el hospedador una serie de respuestas a nivel bioquímico, fisiológico y/o morfológico, y que determinan el desarrollo de dicha interacción (revisado por Halverston y Stacey, 1986, y por Knooge, 1996). Una interacción planta-patógeno se denomina compatible si el fitopatógeno es capaz de infectar al huésped y producir una enfermedad. Es, en cambio, una interacción incompatible si la planta activa rápidamente las respuestas de defensa e impide el desarrollo de la enfermedad. En este último caso, se dice que el patógeno es avirulento.

En los sistemas estudiados, la evidencia de una relación gen a gen en la interacción planta-patógeno es amplia. El análisis genético de diversas razas de patógenos y diversos cultivares de la especie hospedadora ha demostrado que el reconocimiento del patógeno está determinado por la interacción, directa o indirecta, entre el producto de un gen dominante o semidominante de resistencia de la planta (*R*), y el producto del correspondiente gen dominante de avirulencia del patógeno (*Avr*). La expresión de un gen *Avr* de un patógeno origina una señal que induce una fuerte respuesta de defensa en las plantas que poseen el gen *R* apropiado (Flor, 1947; Keen, 1990; De Wit, 1992; revisado por Bent, 1996, por Knooge, 1996, y por Hammond-Kosack y Jones, 1996). De este modo, algunos de los *elicitors* específicos son los productos directos o indirectos de los genes *Avr*.

Los hongos que expresan un gen *Avr* son capaces de infectar a las plantas que carezcan del gen *R* correspondiente. Una planta puede poseer varios genes *R*, y un patógeno, a su vez, puede tener varios genes *Avr*. Además, una variedad que posee un gen *R* puede anular específicamente a fitopatógenos con diferentes genes *Avr*, y la detección de un mismo genotipo *Avr* puede estar determinada por distintos genes *R* (Bisgrove *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1996, revisado por Bent, 1996).

Se han aislado y caracterizado numerosas parejas de genes *Avr* y *R* de bacterias patógenas y las respectivas plantas hospedadoras. El conocimiento de las interacciones entre hongos fitopatógenos y plantas es, sin embargo, mucho más escaso. En la tabla 5 se resumen los genes de avirulencia conocidos de hongos fitopatógenos.

<b>Especie</b>	<b>Gen de avirulencia</b>	<b>Actividad</b>	<b>Función intrínseca</b>	<b>Nivel de especificidad</b>
<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr4</i>	Elicitor	?	Cultivar
<i>C. fulvum</i>	<i>Avr9</i>	Elicitor	?	Cultivar
<i>Rhynchosporium secalis</i>	<i>nip1</i>	Elicitor	Toxina	Cultivar
<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>AVR2-YAMO</i>	Proteasa?	?	Cultivar
<i>M. grisea</i>	<i>PWL1</i>	?	?	Especie
<i>M. grisea</i>	<i>PWL2</i>	?	?	Especie

**Tabla 5: Genes de avirulencia aislados de hongos** (modificado de Knogge, 1996).

Se ha propuesto que los productos de los genes *Avr* son ligandos para los receptores codificados por los genes *R*, y esta interacción origina la cascada de señales que culmina en la respuesta de defensa (Staskawicz *et al.*, 1995; Gabriel y Rolfe, 1990). Este modelo ha sido verificado en algunas ocasiones. Se han aislado y caracterizado numerosos genes *R* de plantas, y las proteínas que codifican presentan una serie de motivos estructurales, a menudo asociados entre sí, y que están implicados en diferentes aspectos de la detección del patógeno y la transducción de señales que se origina (revisado por Bent, 1996). El reconocimiento de dichos motivos en los factores de resistencia, y la presencia de zonas homólogas a proteínas de función y modo de acción conocidos podrían ayudar a desentrañar la función concreta de las proteínas *R*.

Se ha encontrado en las proteínas *R* una serie de motivos estructurales relacionados con la transducción de señales e interacciones proteína-proteína: quinasas de serina y treonina, repeticiones ricas en leucina ("Leucine-Rich-Repeats", LRR), sitios de unión de nucleótidos ("Nucleotide Binding Sites", NBS) y cremalleras de leucina ("Leucine Zipper", LZ).

Los genes de resistencia a enfermedades producidas por hongos que han sido aislados y caracterizados son escasos, y se resumen en la tabla 5. También se señalan los motivos encontrados en las proteínas respectivas, así como los genes de avirulencia correspondientes.

Gen R	Planta	Estructura	Gen Avr	Patógeno
<i>Hm1</i>	Maíz	Reductasa de toxinas	ND	<i>Cochliobolus carbonum</i>
<i>L6</i>	Lino	LRR-NBS	ND	<i>Melampsora lini</i>
<i>Cf-9</i>	Tomate	LRR	<i>Avr9</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>
<i>Cf-2</i>	Tomate	LRR	<i>Avr2</i>	<i>C. fulvum</i>

**Tabla 6. Genes de resistencia al ataque de hongos fitopatógenos** (modificado de Bent, 1996). LRR: repeticiones ricas en leucina, o "leucine-rich repeats"; NBS: sitios de unión de nucleótidos, o "nucleotide-binding sites"; ND: no determinado.

### 2.2.2. Respuesta.

La cascada de señales culmina en una serie de procesos diferentes y complementarios, que se resumen a continuación.

#### 2.2.2.1. Liberación de formas activas de oxígeno.

A menudo, la primera respuesta que se activa en muchas interacciones incompatibles es el aumento del poder oxidativo de los tejidos afectados, mediante la producción de formas activas de oxígeno, o ROS ("Reactive Oxygen Species", Doke *et al.*, 1983; revisado por Hammond-Kosack y Jones, 1996): el  $H_2O_2$  y el  $O_2^{\cdot-}$  son menos reactivos que el  $HO_2^{\cdot}$  y, sobre todo, que el  $OH^{\cdot}$ . Las ROS aparecen tras pocos minutos después de la adición de *elicitors* o bacterias patógenas a cultivos celulares (Nürnberg *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994). Su formación depende de la actividad NADPH oxidasa (Jones, 1994), si bien se han descrito otros mecanismos para la producción de ROS en plantas a partir del ácido oxálico y como resultado de la peroxidasa de la pared celular.

Se han propuesto diversas funciones de las ROS en la defensa de las plantas frente a los fitopatógenos (revisado por Hammond-Kosack y Jones, 1996). En primer lugar, la toxicidad del  $H_2O_2$  y sus derivados puede afectar directamente a los microorganismos patógenos (Peng y Kuck, 1992). Además, las ROS son capaces de oxidar compuestos fenólicos y de atacar a algunos ácidos grasos, convirtiéndolos en peróxidos lipídicos, que alteran la integridad de las membranas plasmáticas y constituyen potenciales señales celulares. Por último, algunas ROS fragmentan el DNA nuclear en sitios específicos (Hallivell y Gutteridge, 1990). El efecto tóxico de las ROS puede originar daños en la propia planta: se ha propuesto que la muerte celular inherente a uno de los mecanismos de defensa de las plantas, la respuesta hipersensible (ver apartado 2.2.2. de esta *Introducción*), es provocada por la aparición de estas moléculas, bien por una acción tóxica directa o bien mediante la inducción de una ruta específica de muerte celular programada (Mittler *et al.*, 1996, Dangl *et al.*, 1996).

Por otra parte, las formas activas de oxígeno unen covalentemente algunos de los elementos de la pared celular, en concreto, las glicoproteínas estructurales ricas en hidroxiprolina (Bradley *et al.*, 1992). El  $H_2O_2$  es, además, indispensable para la formación del polímero de lignina (Hammond-Kosack y Jones, 1996). El refuerzo de la pared celular favorece su función como barrera de defensa.

En cuanto a su papel en la transducción de señales, se ha propuesto que el  $O_2^-$  podría ser una de las señales de coordinación de las respuestas de defensa. Las ROS inducen algunas enzimas de la ruta de biosíntesis del ácido salicílico, una molécula esencial en los procesos de respuesta a patógenos (León *et al.*, 1995). El ácido salicílico, a su vez, inhibe la acción detoxificadora de la catalasa sobre el  $H_2O_2$ , causando de forma indirecta un aumento de los niveles de las ROS (Wu *et al.*, 1995). También inducen algunos mecanismos generales de protección en las células adyacentes a la infección, como la síntesis de glutatión-S-transferasa (Levine *et al.*, 1994). La síntesis de moléculas antimicrobianas, como las fitoalexinas también se incrementa (Apostol *et al.*, 1989). Por último, el balance redox, que se altera por acción de estas moléculas, puede regular la estabilidad de los RNA mensajeros de genes relacionados con la defensa (Mehdy, 1994).

En definitiva, y como conclusión, la producción de ROS origina un daño considerable tanto en el patógeno (efecto antimicrobiano directo e indirecto) y el hospedador (muerte celular en la respuesta hipersensible), y regula una serie de mecanismos protectores adicionales.

La importancia del  $H_2O_2$  en la defensa de las plantas frente a los patógenos se pone de manifiesto en los experimentos con plantas transformadas con un gen de glucosa oxidasa, que presentan altos niveles de  $H_2O_2$  de forma constitutiva. Las plantas transgénicas son más resistentes al ataque de bacterias y hongos fitopatógenos (Wu *et al.*, 1995).

#### **2.2.2.2. La respuesta hipersensible.**

Durante la respuesta hipersensible (“Hypersensitive Response”, HR), el reconocimiento de un patógeno origina un rápido proceso de muerte celular que forma una zona necrótica alrededor del sitio de infección (Agrios, 1988). La HR es un mecanismo muy conservado en las plantas, y está íntimamente asociado a la resistencia de las plantas frente a los patógenos. Su formación se debe en parte a la producción y liberación de compuestos tóxicos, tales como  $H_2O_2$ , y en parte a una respuesta apoptótica, es decir, a la activación de un programa genético de muerte celular programada (Mittler y Lam, 1996).

En cuanto al sentido biológico de la HR, la muerte de las células infectadas podría limitar la difusión del patógeno y, a la vez, permitir la liberación de sustancias tóxicas acumuladas en la vacuola en concentraciones inhibitorias del desarrollo del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996). La liberación de estos compuestos tóxicos serían al mismo tiempo responsables de la muerte de las células vegetales como de las del fitopatógeno.

Durante la respuesta hipersensible se producen señales endógenas que regulan la expresión de genes de defensa (He, 1996). La activación de genes de defensa y la producción de metabolitos secundarios, muchos de ellos con propiedades antimicrobianas, son algunos de los efectos de la HR en zonas no infectadas de la planta (Baillieul *et al.*, 1995). Una de las señales activadas en la HR es el ácido salicílico, una molécula señal clave en la respuesta general a patógenos, e implicada en el fenómeno de la resistencia sistémica adquirida. Por lo tanto, la última consecuencia

de la HR es la aparición de una respuesta en toda la planta que proporciona resistencia a infecciones futuras de patógenos (ver apartado 2.2.3. de esta *Introducción*, Ryals *et al.*, 1996).

### **2.2.2.3. Fortalecimiento de la pared celular.**

Una de las respuestas de defensa de las plantas consiste en la inducción de una serie de cambios en la pared celular de los tejidos afectados encaminados a fortalecerla (revisado por Hammond-Kosack y Jones, 1996). El proceso más inmediato tras la infección es la unión covalente de las moléculas de proteínas estructurales presentes en la pared, en particular de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina. Otro proceso que ocurre con frecuencia rápidamente tras la infección es la formación de calosa, un polímero de  $\beta$ -1,3-glucano que engrosa y refuerza la pared celular. El aumento local del contenido en lignina de la pared celular constituye un mecanismo más tardío de la defensa ante los patógenos.

El fortalecimiento de la pared celular proporciona una serie de ventajas a la planta en su lucha con el patógeno. En primer lugar, impide la liberación de los contenidos intracelulares y, por lo tanto, reduce la disponibilidad de nutrientes para el patógeno. Además, entorpece la difusión de las toxinas y otros factores de patogenicidad al interior de las células vegetales. Por otra parte, los compuestos fenólicos (fenilpropanoides) precursores de la lignina y los radicales libres que se producen durante el proceso de polimerización pueden afectar a la integridad de la membrana del patógeno y, en definitiva, impedir su desarrollo (revisado por Hammond-Kosack y Jones, 1996).

### **2.2.2.4. Producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas.**

Las plantas producen metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antimicrobiana (revisado por Osburn, 1996b). Algunos están presentes en las plantas sanas en forma activa, mientras que la síntesis o la activación de otros tiene lugar durante la infección por patógenos. En ocasiones, la enzima encargada de la activación del precursor inactivo se encuentra en un compartimento celular, aislada de su sustrato, y es necesaria la rotura de la célula para que se produzcan los productos activos. Los hongos se defienden de estos compuestos de diversas formas, bien limitando su crecimiento al apoplasto y minimizando el daño celular a la planta, bien tolerando su acción o detoxificándolos.

#### **- Las fitoalexinas.**

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular, lipofílicos y con propiedades antimicrobianas que se acumulan rápidamente alrededor de los sitios de infección, y en respuesta a una gran variedad de elicitores (revisado por Hammond-Kosack y Jones, 1996). La aparición de fitoalexinas se debe a la acción sincronizada de una serie de enzimas biosintéticas de la ruta de los flavonoides, tales como la PAL (fenil amonio liasa), cuya síntesis *de novo* se induce por patógenos.

Se han obtenido plantas de tabaco que expresan constitutivamente la enzima estibeno sintasa de la ruta de biosíntesis de una fitoalexina (el resveratrol). Las plantas transgénicas presentan unos niveles más elevados del metabolito y, como consecuencia de ello, exhiben una mayor resistencia al ataque por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Hain *et al.*, 1993).

- Compuestos antimicrobianos constitutivos.

Además de las fitoalexinas y los compuestos fenólicos, cuya producción es inducida por patógenos, existen otros compuestos constitutivos en las plantas que presentan actividad antimicrobiana. Entre ellos, las saponinas, los glicósidos cianogénicos y los glucosinolatos han sido estudiados en detalle (revisado por Osburn, 1996 a y b). En algunas ocasiones, se ha encontrado una relación positiva entre la cantidad del compuesto presente en una variedad y su resistencia a las infecciones por hongos. Por otra parte, se ha demostrado que el rango de hospedador de algunos patógenos está determinado por la presencia de mecanismos de detoxificación de estos compuestos.

### 2.2.2.5. Producción de proteínas relacionadas con la patogénesis.

Las proteínas PR (“Pathogenesis-Related”, relacionadas con la patogénesis) forman un amplio y complejo grupo de proteínas intra- o extracelulares que se acumulan en tejidos de plantas o células vegetales en cultivo tras un ataque por patógenos o tratamiento con un *elicitor* (Bowles, 1990). Las proteínas PR se han clasificado en 11 grupos, de secuencias y propiedades bioquímicas e inmunológicas similares (tabla 7). Las proteínas PR ácidas son normalmente secretadas por las células vegetales, mientras que las básicas se acumulan por lo general en la vacuola. En general, éstas exhiben una mayor capacidad antifúngica que aquéllas, sugiriendo para las PR ácidas, más que una función antipatogénica *per se*, un papel inductor de la expresión de genes de defensa (Mauch y Staehelin, 1989; Collinge *et al.*, 1993).

PR-1	
PR-2	$\beta$ -1,3-gucanasas
PR-3	quitinasas
PR-4	
PR-5	proteínas tipo taumatina
PR-6	inhibidores de proteasas

### Tabla 7. Proteínas PR de plantas.

Algunas de las proteínas PR poseen actividad antifúngica y/o antibacteriana *in vitro* (Ponstein *et al.*, 1994; Mauch *et al.*, 1988; Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Melchers *et al.*, 1994). Además, la expresión constitutiva en plantas de algunas proteínas PR origina una mayor tolerancia de las plantas transgénicas al ataque de patógenos (Broglie *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995). La actividad antifúngica de la proteínas PR se incrementa de forma sinérgica al combinarlas entre sí, o con otros compuestos antifúngicos (ver apartado de esta Introducción, Zhu *et al.*, 1994).

Como se muestra en la tabla 7, muchas de las proteínas PR son hidrolasas de los componentes más abundantes de las paredes de la mayoría de los hongos: quitina y  $\beta$ -1,3-glucano. La degradación de la pared celular impide el crecimiento de los hongos, y la liberación de oligosacáridos derivados de la digestión de la quitina y los  $\beta$ -glucanos desencadena la activación de otros mecanismos de defensa. El papel de estas proteínas se discutirá más adelante, en el apartado 3 de esta Introducción, pero su actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* ha sido demostrada en numerosas ocasiones.

Otras proteínas relacionadas con la patogénesis son las tioninas, unas proteínas básicas, ricas en cisteína, que se encuentran en la mayoría de los cereales, y que poseen propiedades antifúngicas (Bohlmán, 1994). Curiosamente, la expresión diferencial de estas proteínas tras un ataque por patógenos no está regulada por la ruta dependiente del ácido salicílico habitual en los mecanismos de defensa, sino que está mediada por la hormona vegetal ácido jasmónico (Epple, 1995). Existen otros péptidos con actividad antimicrobiana, denominados defensinas, similares en estructura y propiedades a las defensinas de reptiles, anfibios y muchos invertebrados. Son péptidos de 45-54 aminoácidos que presentan ocho residuos de Cys, dos de Gly y uno de Glu en posiciones conservadas. Si bien se pueden encontrar en tejidos sanos, su concentración aumenta tras la infección con patógenos (revisado por Broekaert *et al.*, 1995).

Se ha descrito también un aumento en la actividad lipoxigenasa (LOX) relacionada con procesos de incompatibilidad *R-Avr* (Véronési *et al.*, 1996). Esta enzima podría estar implicada en la generación de moléculas señal tales como el ácido jasmónico, el metil-jasmonato o peróxidos lipídicos, que regulan respuestas de defensa específicas. Además, puede contribuir a la muerte celular asociada a la HR mediante daños irreversibles en la membrana celular de las células vegetales. Por otra parte, la actividad LOX origina una serie de metabolitos derivados de los ácidos grasos con actividad antimicrobiana (Croft *et al.*, 1993).

### **2.2.3. Respuesta a largo plazo: la resistencia sistémica adquirida.**

En la mayoría de las plantas, las necrosis inducidas por los patógenos, independientemente de su naturaleza (producidas durante la HR o como síntoma de la enfermedad), originan la activación de una respuesta sistémica y duradera frente a un amplio rango de patógenos (Chester, 1933, revisado por Ryals *et al.*, 1996). La resistencia sistémica adquirida ("Systemic Acquired Resistance", SAR) posee en cada especie un característico espectro de acción y está acompañada de una serie de cambios en la expresión de una batería de genes que no incluye a todos los relacionados con la defensa. La mayoría de las proteínas asociadas al proceso sistémico pertenecen al grupo de las PR, aunque la identidad de los genes que se inducen durante la SAR y sus niveles de expresión varían en diferentes especies. En tabaco, los marcadores de la SAR incluyen formas ácidas de las PR-1, una PR-1 básica,  $\beta$ -glucanasas extra- e intracelulares, quitinasas de tipo II, formas ácida y básica de una quitinasa de tipo III, proteínas tipo heveína y proteínas tipo taumatina (Ward *et al.*, 1991). Otra familia de proteínas básicas, denominadas SAR 8.2, también se inducen durante la resistencia sistémica, pero presentan otro patrón de expresión (Ward *et al.*, 1991).

La naturaleza sistémica de la SAR requiere la existencia de una molécula señal que se propague por toda la planta. Esta señal es reconocida en las células diana e inicia una ruta de transducción de señales que culmina en la inducción de la resistencia sistémica en la planta completa. Los estudios con mutantes y con plantas transgénicas incapaces de acumular ácido salicílico revelan la importancia de la acumulación de esta molécula en la señalización de la resistencia a los patógenos, tanto local como sistémica. Los niveles de SA aumentan varios cientos de veces tras una infección por patógenos (Ryals *et al.*, 1996). La aplicación exógena de SA induce la síntesis de las proteínas PR y la respuesta local de defensa (Malamy y Klessig 1992). Por otra parte, plantas de tabaco transformadas con el gen *NahG*, cuyo producto convierte el SA en la molécula inactiva catecol, son incapaces de acumular SA, así como de inducir la SAR. La ausencia de SA en *Arabidopsis* transformados con *NahG* impide la aparición de las resistencias local y adquirida (Gaffney *et al.*, 1993). Sin embargo, y a pesar de que el SA es transportado a zonas cercanas de la planta desde el lugar de infección, esta molécula no constituye la señal translocada, puesto que al eliminar las hojas infectadas antes de la acumulación del SA en el floema, o al infectar raíces transgénicas *NahG* injertadas en una planta silvestre, la SAR se induce de igual modo (Rasmussen *et al.*, 1991; Vernooij *et al.*, 1994).

El papel del salicílico en la respuesta a patógenos es múltiple. En los tejidos infectados, en los cuales la síntesis de SA está inducida, un receptor de esta molécula podría mediar la inducción de genes SAR. Tras el establecimiento de esta respuesta, en el tejido aparecen rápidamente formas activas de oxígeno. La acumulación de SA en los sitios de infección inhibe la actividad catalasa; por lo tanto, el poder oxidativo de la zona se incrementa, y tienen lugar varias respuestas de defensa: muerte celular programada, síntesis de proteínas PR y síntesis de SA en las células adyacentes. Esta defensa local está, por lo tanto, amplificada en la zona de la infección. La señal que se transloca, en cambio, induce a través del ácido salicílico la respuesta sistémica descrita anteriormente.

Existen otras moléculas implicadas, en mayor o menor medida, en la transducción de señales que culmina en la aparición de las resistencias local y/o sistémica: el polipéptido sistemina, los jasmonatos (ácido jasmónico y metil-jasmonato), y la molécula volátil etileno (Ecker, 1995; revisado por Enyedi *et al.*, 1992). Estas moléculas no constituyen, sin embargo, la señal que se transloca por toda la planta e induce la SAR, puesto que ninguna de ellas, a concentraciones fisiológicas, es capaz de estimular la resistencia a patógenos. Además, existen mutantes insensibles a etileno cuya capacidad de disparar la HR frente a un patógeno incompatible permanece intacta. En cuanto a la sistemina, el RNA mensajero que la codifica se induce sistémicamente tras una herida.



### 3. HIDROLASAS INDUCIDAS POR PATÓGENOS.

#### 3.1. $\beta$ -1,3-glucanasas.

El  $\beta$ -1,3-glucano es, junto con la quitina, el componente mayoritario de la pared celular de la mayoría de los hongos. Está compuesto por cadenas de glucosa unidas por enlace  $\beta$ -1,3-glucosídico, a veces con ramificaciones de glucosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,6.

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas están ampliamente distribuidas en las plantas, que poseen numerosas isoformas de esta enzima. Se han identificado al menos tres tipos de  $\beta$ -1,3-glucanasas en estos organismos. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de tipo I son proteínas básicas, localizadas en la vacuola. Las de tipo II son proteínas ácidas, extracelulares, relacionadas serológicamente con las del tipo anterior. Finalmente, las  $\beta$ -1,3-glucanasas del tipo III son también ácidas y extracelulares, homólogas a las proteínas del tipo II en un 54-59%. Por otra parte, se han descrito varias  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas que exhiben también actividad  $\beta$ -1,4-glucanasa (Wolf, 1992, Lai *et al.*, 1993, Meikle *et al.*, 1994)

La actividad  $\beta$ -glucanasa se ha encontrado en raíces (Felix y Meins, 1986), en ciertos estadíos del desarrollo de las flores (Neale *et al.*, 1990; Hird *et al.*, 1993), en semillas, germínulas (Leah *et al.*, 1991), y en hojas senescentes, generalmente unida a la presencia de quitinasas (ver apartado 3.2. de esta Introducción). Las  $\beta$ -glucanasas está implicada en procesos de división celular, formación de polen y germinación de semillas (Vögeli-Lange *et al.*, 1994). En ciertos tejidos más susceptibles al ataque por fitopatógenos, como son las semillas y las flores, la expresión constitutiva de glucanasas, asociada a la de otras proteínas con actividad antifúngica, podría poseer, además, una función defensiva (Leah *et al.*, 1991)

Los  $\beta$ -glucanos están presentes en las paredes celulares vegetales en forma de deposiciones de calosa, que se forman como protección tras una infección o herida, y en los haces vasculares en desarrollo. Posteriormente a la agresión o la formación de los haces vasculares, la calosa es retirada de forma fisiológica mediante la acción de las  $\beta$ -1,3-glucanasas.

La inducción de las  $\beta$ -glucanasas como respuesta a infecciones por hongos, bacterias y virus, o tras el tratamiento con *elicitors* fúngicos o de la planta ha sido ampliamente comprobada (Sela-Buurlage *et al.*, 1993). La presencia de  $\beta$ -glucanos estructurales en las paredes de los hongos hacen de esta enzima una candidata para una defensa efectiva frente al ataque por estos organismos. De hecho, algunas proteínas PR han sido identificadas como  $\beta$ -1,3-glucanasas, y se ha comprobado la actividad antifúngica *in vitro* de las isoformas intracelulares, así como el efecto sinérgico que ambos tipos presentan en combinación con quitinasas (Kombrink *et al.*, 1988; Mauch *et al.*, 1988; Seela-Buurlage *et al.*, 1993).

Se ha sugerido que las glucanasas vacuolares constituyen una línea defensiva tardía, al ser lisada la célula por la acción del patógeno o como consecuencia de la HR, y al liberarse estas enzimas en altas concentraciones (Mauch y Staehelin, 1989). El papel primordial en la defensa de las glucanasas apoplásticas sería, entonces, el de

liberar fragmentos de  $\beta$ -glucanos como consecuencia de una temprana y parcial degradación de las paredes fúngicas. Estas moléculas servirían de *elicitors* del resto de proteínas PR y otros genes de estrés, que amplificarían la respuesta (Beerhues y Kombrink, 1994).

La actividad antifúngica *in vivo* de las  $\beta$ -1,3-glucanasas vegetales ha sido analizada por transformación de plantas con los genes correspondientes. Plantas de *Nicotiana sylvestris* cuya expresión de una  $\beta$ -1,3-glucanasa de tipo I está anulada gracias a la expresión de un fragmento del gen correspondiente en orientación antisentido (contraria a la codificante), no exhiben mayor susceptibilidad al hongo fitopatógeno *Cercospora nicotianae*. Estos experimentos no son, sin embargo, concluyentes, y no descartan que la misma enzima pudiera ser importante en la resistencia contra otros patógenos fúngicos, o bien que otras isoenzimas existentes en la planta pudieran exhibir esta actividad antifúngica (Neuhaus *et al.*, 1992). De hecho, se ha demostrado que este efecto se debe al aumento de los niveles de otra  $\beta$ -1,3-glucanasa en las plantas transgénicas, fenómeno que se denomina compensación génica (Beffa *et al.*, 1993).

Plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan una  $\beta$ -1,3-glucanasa de cebada son más resistentes a la infección del hongo *Rhizoctonia solani* (Jach *et al.*, 1995). Este efecto protector de las  $\beta$ -1,3-glucanasas aumenta de forma sinérgica al sobreexpresar simultáneamente dichas enzimas junto con quitinasas u otros compuestos antifúngicos (Zhu *et al.*, 1994; Jongedlijk *et al.*, 1995; Jach *et al.*, 1995, ver apartado 3.3. de esta Introducción).

### 3.2. Quitinasas.

Uno de los mecanismos de defensa de las plantas consiste en la inducción de los genes de defensa, algunos de los cuales codifican enzimas hidrolíticas. Entre ellas, las quitinasas (EC 3.2.1.14) catalizan la hidrólisis de la quitina. Se ha descrito la presencia de exoquitinasas y endoquitinasas en plantas, si bien éstas son más abundantes en plantas que aquellas, y han sido estudiadas en profundidad (revisado por Collinge *et al.*, 1993 y por Graham y Sticklen, 1994). La mayoría de estas endoquitinasas exhiben también actividad lisozima, es decir, que son capaces de hidrolizar los enlaces entre los residuos de ácido N-acetil-murámico y GlcNAc presentes en el peptidoglucano de las paredes celulares bacterianas, y han sido por lo tanto propuestas como mediadoras de la defensa de la planta frente a bacterias (Düring, 1993). Recíprocamente, la mayoría de las lisozimas vegetales poseen actividad quitinasa.

Según su estructura primaria y su localización celular, las quitinasas de plantas han sido clasificadas en 6 tipos, que se esquematizan en la figura 3 (Collinge *et al.*, 1993; Graham y Sticklen, 1994; Meins *et al.*, 1994).

- Las quitinasas de tipo I son proteínas básicas que suelen encontrarse en la vacuola. Como características estructurales, poseen un péptido señal, un dominio rico en cisteína de unos 40 aminoácidos en la zona amino terminal, una zona hipervariable de unos 20 residuos, la región catalítica muy conservada y un fragmento carboxilo-terminal que se procesa postraduccionalmente y dirige a la proteína hacia la vacuola (Melchers *et al.*, 1993; revisado por Nakamura y Matsuoka, 1993). La región rica en

cisteínas es homóloga a la que aparece en otras proteínas tales como la aglutinina, la heveína y otras proteínas con capacidad de unirse a quitina. Constituye, por lo tanto, el dominio de unión a este polisacárido (Iseli *et al.*, 1993). La actividad quitinasa presente en las plantas suele ser mayoritariamente debida a estas proteínas, a las que se les ha atribuido un papel directo en la lisis de los hongos fitopatógenos (Collinge *et al.*, 1993).

- Las quitinasas de tipo II son generalmente ácidas, y se encuentran en el apoplasto. Estructuralmente son muy homólogas a las del tipo anterior, pero carecen del dominio rico en cisteínas, así como de la extensión carboxilo-terminal que las dirige hacia la vacuola. Su contribución a la actividad quitinasa total de las plantas suele ser baja. Este hecho, y su localización extracelular, sugieren una función reguladora en las interacciones planta-patógeno (Collinge *et al.*, 1993).

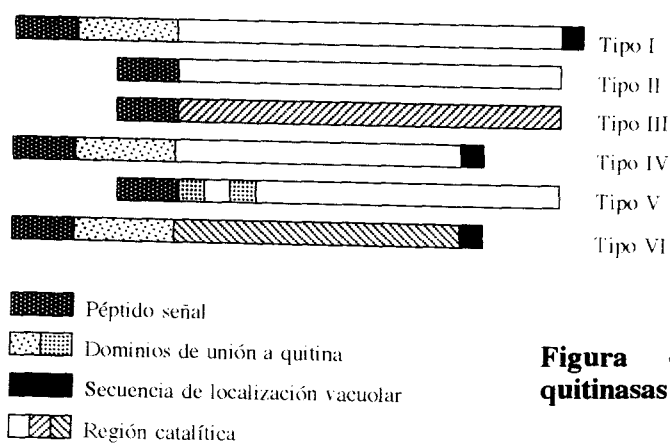
- Las quitinasas de tipo III son enzimas extracelulares cuyo dominio catalítico difiere del de las proteínas anteriores. La mayoría de estas quitinasas presentan homología con proteínas bifuncionales lisozima-quitinasa (Bernasconi *et al.*, 1987). Algunas de ellas, además, presentan una débil homología con quitinasas bacterianas (Watanabe *et al.*, 1992).

- Las quitinasas de tipo IV son estructuralmente similares a las del tipo I, pero presentan dos deleciones que las acortan con respecto a éstas.

- Las quitinasas de tipo V se caracterizan por la presencia de dos dominios de unión a la quitina en la región amino-terminal.

- Las quitinasas de tipo VI son estructuralmente similares a las del tipo IV, pero presentan una homología significativa con las quitinasas bacterianas (Melchers *et al.*, 1994).

Existen excepciones a esta clasificación. Por ejemplo, al menos dos quitinasas básicas de patata se encuentran en el espacio extracelular (Kombrink *et al.*, 1988); una quitinasa básica de cebada carece del dominio de unión a quitina, si bien el resto de la proteína es muy homólogo a las quitinasas de tipo I (Leah *et al.*, 1987); dos quitinasas de ajo poseen un punto isoelectrónico ácido pero estructuralmente pertenecen al tipo I (Van Damme *et al.*, 1993).



**Figura 4. Estructura de las quitinasas de plantas.**

Como se ha señalado anteriormente, las quitinasas de plantas se inducen específicamente como respuesta al ataque de patógenos. La expresión de la actividad quitinasa, al igual que el resto de proteínas PR, se induce como parte de los mecanismos de defensa frente al ataque de patógenos. En primer lugar, la infección de una planta por patógenos, ya sean víricos, bacterianos o fúngicos, conlleva un aumento considerable en la actividad quitinasa (revisado por Graham y Sticklen, 1994). Esta inducción es más intensa en las zonas de infección, y decrece paulatinamente hacia la periferia, como demuestran los estudios de regulación del promotor de una quitinasa de judía (Roby *et al.*, 1990). La presencia de actividad quitinasa en partes no infectadas de la planta inducida durante la SAR ha sido demostrada en numerosas ocasiones (Métraux y Boller, 1986), aunque a veces no forma parte de esta respuesta (Uknes *et al.*, 1992).

Se ha observado una inducción de la actividad quitinasa por sustancias que actúan como señales celulares de la respuesta de defensa. El tratamiento con etileno origina un incremento coordinado de las actividades  $\beta$ -glucanasa y quitinasa, y un inhibidor de la biosíntesis de esta molécula reduce la acumulación de quitinasa en plantas de judía y melón (Broglie *et al.*, 1986, 1989; Roby *et al.*, 1985, 1986). Asimismo, el tratamiento de plantas sanas con ácido salicílico induce, como se ha descrito anteriormente, la acumulación de quitinasas y  $\beta$ -glucanasas: en hojas de *Arabidopsis*, la actividad GUS controlada por el promotor de una quitinasa de esta misma planta se induce por SA (Samac y Shah, 1991). Las quitinasas vegetales pueden inducirse, finalmente, por *elicitors*, vegetales o fúngicos, y por una serie de estreses abióticos, como la herida mecánica y la presencia de metales pesados o sales inorgánicas (revisado por Graham y Sticklen, 1994). En cualquier caso, las isoformas que se inducen por cada molécula inductora pueden ser diferentes (revisado por Graham y Sticklen, 1994).

Sin embargo, también están presentes en condiciones no relacionadas con estrés externo alguno, lo cual sugiere otras funciones endógenas. Se han encontrado quitinasas en plantas sanas, en ausencia de patógenos o sus *elicitors* (Regalado y Ricardo, 1996; Shinshi *et al.*, 1987; Lotan *et al.*, 1989; Kragh *et al.*, 1990). En estos casos, su presencia está restringida a ciertos órganos o tejidos. Se ha descrito la presencia de quitinasas en ciertas etapas del desarrollo de flores (Harikrishna *et al.*, 1981; Neale *et al.*, 1990), en raíces (Shinshi *et al.*, 1987; Neale *et al.*, 1990; Clarke *et al.*, 1994; Del Campillo *et al.*, 1992), tubérculos (Araki *et al.*, 1992), frutos (Collado *et al.*, 1992; Leah *et al.*, 1991) y en tejidos senescentes (Legrand *et al.*, 1987), así como en hojas jóvenes (Clarke *et al.*, 1994). Las quitinasas se encuentran entre la primera batería de genes cuya expresión es potenciada por tratamientos con auxinas y citoquininas (Meeks-Wagner *et al.*, 1989; Neale *et al.*, 1990). No se puede descartar, sin embargo que esta regulación hormonal o de desarrollo de la expresión de algunas quitinasas mantenga el sentido protector frente al ataque por patógenos que se atribuye a estas proteínas. De este modo, y dado que la presencia de quitinasas en estos tejidos y/o circunstancias suele estar asociada a la presencia de  $\beta$ -glucanasas y otras sustancias antimicrobianas, se ha sugerido que estas enzimas protegerían dichas estructuras, más sensibles a agresiones externas, de ataques por fitopatógenos (Shinshi *et al.*, 1987; Memelink, 1988; Neale *et al.*, 1990; Regalado y Ricardo, 1996).

Recientemente se han encontrado claras evidencias de la existencia de un papel de las quitinasas diferente al defensivo. Unos mutantes de zanahoria incapaces de sufrir embriogénesis somática recuperan esta capacidad al añadir al medio de cultivo una quitinasa (De Jong *et al.*, 1992; Kragh *et al.*, 1996). La adición del factor Nod de nodulación, un lipooligosacárido de GlcNAc que simula la organogénesis de nódulos simbióticos en leguminosas (Truchet *et al.*, 1991) también es capaz de devolver el fenotipo silvestre a cultivos del mutante (de Jong *et al.*, 1993). Es posible que, en este caso, la quitinasa esté liberando al medio las señales necesarias (probablemente, oligo-GlcNAc, más o menos complejos) para este proceso. Sin embargo, la búsqueda de un sustrato para las quitinasas en las plantas no ha sido muy fructífera. Solamente se han encontrado evidencias de la existencia de oligosacáridos de GlcNAc en las paredes celulares secundarias de una solanácea, pues se ha observado la unión en esta zona de quitinasas bacterianas y de la aglutinina de germen de trigo, lectina específica de oligómeros de GlcNAc (Benhamou y Asselin, 1989).

La intensidad de la inducción de la actividad quitinasa puede depender de la compatibilidad de una infección. Fink *et al.* (1990) han demostrado que la infección de cebada con cepas compatibles de *Puccinia* no producen alteraciones en los niveles de actividad quitinasa de la planta, mientras que durante la reacción incompatible los niveles de esta enzima aumentan rápidamente. Otros estudios demuestran que, en muchas interacciones de plantas con hongos fitopatógenos los niveles de enzima, actividad y/o mensajero en las etapas tempranas de las infecciones son mayores en cultivares resistentes que en los cultivares susceptibles (Danhash *et al.*, 1993).

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado la actividad antifúngica de quitinasas frente al crecimiento de hongos filamentosos que contienen quitina en su pared. En la tabla 8 se resumen las quitinasas que se han ensayado, así como la especie de la que proceden, y el hongo al cual se enfrentan (Graham y Sticklen, 1994).

Origen de la quitinasa	Hongo ensayado	Respuesta antipatogénica	Sinergia con $\beta$ -glucanasas
Guisante	<i>Ascochyta pisi</i>	N.D.	Sí
Arabidopsis	<i>Alternaria solani</i>	No	N.D.
Guisante	<i>Aspergillus niger</i>	N.D.	Sí
Guisante	<i>Athefia bombacina</i>	N.D.	Sí
Trigo	<i>Botrytis cinerea</i>	No	N.D.
Tabaco	<i>B. cinerea</i>	No	N.D.
<i>Crataegus</i> sp.	<i>B. cinerea</i>	No	N.D.
Arabidopsis	<i>Fusarium solani</i>	No	Sí
Guisante	<i>F. solani</i>	No	N.D.
Judía	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	Sí	Sí
Arabidopsis	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	No	N.D.
Guisante	<i>Penicillium digitatum</i>	No	Sí
Trigo	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	Sí	N.D.
Tabaco	<i>P. blakesleeanum</i>	Sí	N.D.
Manz. Esp	<i>P. blakesleeanum</i>	Sí	N.D.
Arabidopsis	<i>Phytophthora megasperma</i>	No	N.D.
Judía	<i>Rhizoctonia solani</i>	Sí	N.D.
Arabidopsis	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	No	N.D.
Guisante	<i>Thielaviopsis basicola</i>	N.D.	Sí
Trigo	<i>Trichoderma hamatum</i>	Sí	N.D.
Tabaco	<i>Trichoderma hamatum</i>	Sí	N.D.
<i>Crataegus</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i>	Sí	N.D.
Arabidopsis	<i>Trichoderma reesei</i>	Sí	N.D.
Judía	<i>Trichoderma reesei</i>	Sí	Sí
Judía	<i>Trichoderma viride</i>	Sí	Sí

**Tabla 8. Efecto antifúngico de quitinasas aisladas de plantas** (modificado de Graham y Sticklen, 1994). La última columna indica la existencia de efecto sinérgico con  $\beta$ -1,3-glucanasas (ver apartado 4 de esta introducción). N.D.: no determinado.

Se han expresado quitinasas en plantas, y se ha ensayado la resistencia de las plantas transgénicas frente a hongos fitopatógenos. Los resultados no han sido siempre positivos. Neuhaus *et al.* (1991b) transforman plantas de tabaco con una quitinasa de la misma planta, pero la susceptibilidad de las plantas transgénicas frente a la infección por el hongo *Cercospora nicotianae* permanece inalterada. En algunas de estas plantas se observa que los niveles de actividad quitinasa son insólitamente más bajos que los de las plantas control. Este fenómeno, denominado supresión génica o cosupresión, tiene lugar cuando varias copias de genes homólogos coexisten en el mismo genoma (Kunz *et al.*, 1996). En cualquier caso, incluso las plantas con altos niveles de quitinasa presentan una inalterada susceptibilidad al fitopatógeno. Se ha expresado en Arabidopsis el RNA antisentido de una quitinasa de tipo I de la misma planta. Las plantas transgénicas, incapaces de acumular más del 10-40% de la actividad quitinasa de las plantas control, no presentan ninguna variación en cuanto a la susceptibilidad al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Samac *et al.*, 1994). Sin embargo, y al igual que sucede con las  $\beta$ -1,3-glucanasas, estos experimentos no son concluyentes, dada la cantidad de isoenzimas diferentes que una planta posee y la diferente actividad *in vitro* que cada una de ellas presenta frente a cada patógeno.

Por otra parte, Broglie *et al.* (1991) han transformado plantas de tabaco y de nabo con una quitinasa básica de judía y consiguen niveles de actividad quitinasa en las

plantas transgénicas 50 veces mayor que los de las plantas control. Las plantas transformadas crecen mejor que las plantas sin transformar en presencia del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* y presentan síntomas de la enfermedad en menor proporción. La mortalidad de las germinulas en presencia del patógeno pasa del 53% al 37%. Se ha sugerido que la eficacia de esta quitinasa en especies heterólogas podría estribar en las diferencias en propiedades que posee con respecto a las quitinasas endógenas (Lamb *et al.*, 1992).

Lin *et al.* (1995) estudian el efecto antipatogénico de la quitinasa de arroz por sobreexpresión de la enzima en plantas de arroz. Los resultados muestran que la resistencia de cada planta transgénica está correlacionada con los niveles de actividad quitinasa que presentan. Por último, la expresión de una quitinasa ácida de cebada en plantas de tabaco confiere a las plantas transgénicas una mayor resistencia al ataque del hongo *R. solani*. Este efecto protector de la quitinasa aumenta de forma sinérgica al expresar a la vez esta enzima con una  $\beta$ -1,3-glucanasa o con otras proteínas antifúngicas (Jach *et al.*, 1995; ver apartado siguiente).

### **3.3. Efecto sinérgico de las quitinasas vegetales y otras sustancias antimicrobianas.**

Al igual que algunas quitinasas de *Trichoderma* (ver apartado 1.4. de esta Introducción), las quitinasas vegetales presentan un efecto sinérgico *in vitro* e *in vivo* con otras enzimas hidrolíticas y compuestos antifúngicos (ver tabla 8). Mauch *et al.* (1988), al estudiar el efecto antifúngico de una quitinasa básica de guisante, encuentran que las hifas de algunos patógenos (en concreto, *Fusarium solani*, *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*) son resistentes a la quitinasa y a una  $\beta$ -1,3-glucanasa, pero no a la mezcla de ambas enzimas. Sela-Buurlage *et al.* (1993) también encuentran un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* al combinar la quitinasa básica o la ácida con la  $\beta$ -1,3-glucanasa básica de tabaco. El mismo efecto es observado también con una quitinasa de tipo VI de tabaco en combinación con la  $\beta$ -1,3-glucanasa de tipo I (Melchers *et al.*, 1994).

Por otra parte, se han realizado experimentos de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos con mezclas de quitinasas y otras proteínas antipatogénicas no hidrolíticas. Leah *et al.* (1991) demuestran la sinergia de una quitinasa y una proteína inactivadora de ribosomas (Ribosome-Inactivating-Protein, RIP), ambas de cebada, cuyos efectos antifúngicos por separado habían sido determinados previamente, frente a los hongos *Trichoderma reesei*, *Fusarium sporotrichioides*, *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*. El efecto es aún mayor al combinar ambas proteínas con una  $\beta$ -1,3-glucanasa de la misma planta.

Los estudios realizados con plantas transgénicas que sobreexpresan varias proteínas con propiedades antifúngicas refuerzan los datos de los ensayos *in vitro*. En concreto, se han transformado plantas de tabaco con diferentes combinaciones de las proteínas antifúngicas de cebada anteriormente citadas: quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y RIP. La protección que confiere cada proteína por separado se incrementa notablemente de forma sinérgica al expresar simultáneamente la quitinasa y la glucanasa o la quitinasa y la RIP (Jach *et al.*, 1995). En este estudio se observa, además, que la protección ejercida por la quitinasa y por la RIP presenta un efecto de saturación al aumentar el

porcentaje de expresión de la proteína introducida. Esto puede explicarse, en el primer caso, por la limitada accesibilidad a la quitina que el patógeno permite (tan sólo la zona apical de crecimiento de las hifas presentan la quitina al exterior), y, en el segundo caso, por la limitación de la entrada al citoplasma de la proteína RIP a las zonas apicales, más dificultosa en zonas maduras de la hifa que contienen capas de polisacáridos adicionales.

Estos estudios, junto con otras observaciones, sugieren un mecanismo de sinergia en el cual las glucanasas permiten el acceso a zonas de la pared celular antes inaccesibles para la quitinasa y viceversa. La acción hidrolítica de estas proteínas, a su vez, facilitan el acceso a la proteína RIP a las células fúngicas.

Otro tipo de experimentos consiste en la expresión heteróloga de genes de quitinasas. En el apartado anterior se sugería que la eficacia antipatogénica de la quitinasa de judía expresada en tabaco y nabo podría deberse a la complementación de las propiedades de las quitinasas existentes en la planta transformada. En este sentido, se ha trabajado con una quitinasa de la bacteria *Serratia marcescens*, cuya actividad antipatogénica se había demostrado al expresarla en células de *E. coli*. Las bacterias transformantes eran capaces de controlar la infección de germínulas de judía por diversos patógenos. Además, las plantas de tabaco transgénicas que expresan esta quitinasa son más resistentes al ataque por el fitopatógeno *R. solani* (Oppenheim y Chet, 1992).



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. ORGANISMOS.

### 1.1. BACTERIAS.

Las cepas de bacterias utilizadas en este trabajo se resumen en la tabla 9:

<i>Escherichia coli</i> NM522 (Stratagene, LaJolla, USA)	D( <i>lac-pro AB</i> ), <i>thi</i> , <i>hsd D5</i> , <i>sup E</i> , [ <i>F'</i> , <i>pro AB</i> , <i>lac IqZDM15</i> ].
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>rec A1</i> , <i>end A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>thi</i> , <i>hsd R17</i> , <i>sup E44</i> , <i>rel A1</i> , <i>lac</i> , [ <i>F'</i> , <i>pro AB</i> , <i>lac IqZDM15</i> , Tn10, ( <i>tet<sup>r</sup></i> )].
<i>E. coli</i> Y1090 (Promega, Madison, WI, USA)	<i>F'</i> , D( <i>lacU169</i> ), <i>pro A<sup>+</sup></i> , D( <i>lon</i> ), <i>araD139</i> , <i>strA</i> , <i>supF</i> , [ <i>trp C22::Tn10(tetr)</i> ], (pMC9), <i>hsdR</i> ( <i>rk<sup>-</sup></i> , <i>mk<sup>+</sup></i> ).
<i>E. coli</i> DH5a (Promega)	F80d <i>lac Z</i> ΔM15, <i>rec A1</i> , <i>end A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsd R17</i> ( <i>rk<sup>-</sup></i> , <i>mk<sup>+</sup></i> ), <i>sup E44</i> , <i>rel A1</i> , <i>deo R</i> , Δ( <i>lac ZYA-arg F</i> )U169.
<i>E. coli</i> CJ236	<i>dut</i> , <i>ung</i> , <i>thi</i> , <i>relA</i> : pCJ105 (Cm <sup>r</sup> ).
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	plásmidos Cr (críptico), pAL4404 C58-C9, <i>str<sup>r</sup></i> , <i>thi<sup>+</sup></i>

Tabla 9: Estirpes de *E. coli* y *A. tumefaciens* y su genotipo.

### 1.2. HONGOS FILAMENTOSOS.

En la tabla 10 se presentan los hongos utilizados, así como su procedencia.

Especie	Estirpe	Procedencia
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2413	Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot (Valencia)
<i>T. viride</i>	CECT 2423	id.
<i>Gliocladium (T.) virens</i>	CECT 2460	id.
<i>T. koningii</i>	CECT 2412	id.
<i>T. longibrachiatum</i>	CECT 2606	id.
<i>T. reesei</i>	CECT 2414	id.
<i>Rhizoctonia solani</i>	CECT 2815	id.
<i>Botrytis cinerea</i>	CECT 2100	id.
<i>Fusarium oxysporum</i>	CECT 2154	id.
<i>T. harzianum</i>	IMI 206040	Universidad de Gante (Bélgica)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	IMI 58289	id.
<i>R. solani</i>	1556 y D2	Universidad de Nápoles (Italia)

Tabla 10: Hongos filamentosos utilizados.

### 1.3. PLANTAS.

La variedad de tabaco utilizada en este trabajo ha sido *Nicotiana tabacum* var. Xhanti.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO. MANTENIMIENTO DE LAS MUESTRAS Y OBTENCIÓN DE MATERIAL.

### 2.1. BACTERIAS.

Las bacterias, tanto *E. coli* como *A. tumefaciens*, se cultivan en medio LB. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, se suplementa el medio con 100µg/ml de ampicilina o kanamicina (LB+Amp100 y LB+Kan100, respectivamente), y para la selección de *Agrobacterium* frente a *E. coli*, 250µg/ml de estreptomycin (Str250). La cepa de *E. coli* CJ236 se cultiva en medio LB con 30 µg/ml de cloranfenicol (Cam30). La actividad β-galactosidasa se detecta añadiendo al medio el sustrato X-gal a 40 µg/L, cuya hidrólisis por la acción de la enzima origina colonias azules.

**Medio LB:** 10 g/L bactotripton, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar (sólo para cultivo sólido).

### 2.2. HONGOS FILAMENTOSOS.

#### 2.2.1. Cultivo sólido. Esporulación.

Los hongos se mantuvieron en medio rico PDA, en el cual son capaces de esporular. En el caso de *R. solani*, que no esporula, el medio PDA se usó para obtener discos de micelio.

Las esporas se recogen añadiendo en cada placa 10ml de agua estéril a la superficie del micelio ya esporulado y rascando suavemente con un asa estéril. En el caso de *B. cinerea*, cuyas esporas son muy hidrófobas, se añade al agua 0.1% de Tritón X-100.

Para eliminar los restos de micelio, la suspensión se filtra con papel de filtro estéril. Las esporas se lavan varias veces con agua, se resuspenden en 5-10 ml de agua y se cuentan en una cámara de Burkner.

Una vez lavadas y a la concentración deseada, las esporas pueden almacenarse a 4°C durante 1 ó 2 semanas. Para periodos más largos, se añade 10% de glicerol y se guardan a -20 ó -80°C.

**Medio PDA:** 20 g/L extracto de patata\*, 20 g/L glucosa, 20 g/L agar.

\*Puré de patatas comercial (Riera-Marsá, España), o PDB ("Potato Dextrose Broth", Difco, España)

#### 2.2.2. Cultivo líquido.

Los hongos se pueden mantener en medio mínimo Czapek (CZ), o en medio rico PDB, que es el mismo que el PDA pero no contiene agar.

6 Para la obtención de DNA de *Trichoderma* y *Gliocladium*, se inoculan aproximadamente  $10^6$  esporas en 400 ml de medio CZ con glucosa al 10%. Tras 4 días de incubación a 28°C, y con agitación a 250 rpm, las hifas se recogen por filtración en un kitasato adaptado a una bomba de vacío, se lavan abundantemente con 0.1 M de  $MgCl_2$  y agua. El material se recoge y se sumerge en  $N_2$  líquido. Si no se usa inmediatamente, se puede almacenar a -80°C.

En algunos experimentos se cultivó *T. harzianum* en medio CZ que contenía micelios autoclavados de diversos hongos filamentosos como única fuente de carbono. Para la obtención de los micelios, se inoculan esporas o discos de micelio, y se incuban durante 4 días a 28°C y 250rpm de agitación. Los cultivos se autoclavan, se filtran y se lavan tal como se ha descrito anteriormente.

Los cultivos destinados a la obtención de ARN se obtuvieron a partir de los micelios que habían crecido durante 4 días en CZ con glucosa al 10%. Tras filtrarlos y lavarlos, se inoculan nuevamente en matraces con CZ y la fuente de carbono adecuada. Se incuban a 28°C con agitación durante 2 días, pasados los cuales el micelio se recoge como se ha descrito anteriormente y se mantiene a -80°C hasta su uso.

Los hongos utilizados en los análisis de resistencia de las plantas transgénicas se inoculan en PDB líquido a partir de trozos de micelio, y se incuban con agitación a 25°C. El micelio se recoge, se lava y se homogeneiza en agua. Cuando el hongo es capaz de esporular, se recogen las esporas de las placas con PDA, y se lavan y cuantifican como se ha descrito en el apartado 2.2.1.

**Medio mínimo Czapek (CZ):** Sales CZ: 0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 g/L  $NH_4Cl$ , 1 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.16g/L  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ . Además, se añade una fuente de carbono, la adecuada para el experimento.

## 2.3.PLANTAS.

### 2.3.1. Esterilización de semillas.

La superficie de las semillas se esteriliza mediante lavados sucesivos en hipoclorito sódico 7-8% (20 min.), y al menos tres veces en agua destilada estéril.

Las semillas de tabaco estériles, embebidas en oscuridad durante 24h en agua, se colocan en cajas de Petri con medio MS (semillas silvestres) o con medio MS + kanamicina 300 mg/ml, MSK300 (semillas de plantas transgénicas) y se incuban a 25°C en una cámara de plantas con luz y temperatura controladas, bajo un régimen de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 25°C de temperatura constante.

### 2.3.2. Medio Hoagland. Cultivo hidropónico.

Las plantas de tabaco se adaptan mediante algodón hidrófobo en contenedores con las raíces o el tallo sumergidos en la **solución nutritiva Hoagland II** (Jones *et al.*, 1982) diluida al 50%, con aireación. Se cultivan en cámaras de plantas con intensidad de luz, temperatura y humedad controladas: 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 25°C y 18°C de temperatura, y 80% y 90%

de humedad, respectivamente. Este procedimiento se ha utilizado para la multiplicación vegetativa de plantas de tabaco. Para adecuar las plántulas a las nuevas condiciones de humedad, los primeros días se cubren con bolsas de plástico transparente.

#### **Solución nutritiva de Hoagland II:**

**Macronutrientes:** 1 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 6 mM  $\text{KNO}_3$ , 4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ . Las sales se diluyen a partir de una solución stock 1M de cada una.

**Micronutrientes:** 46.25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9.15  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.76  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.32  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.11  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Se añaden a partir de una solución stock 1000 x.

**Solución de hierro:** 10 ppm Sequestrene® (Ciba Geigi, Basilea, Suiza). Se añade a partir de una solución stock al 0.5%.

#### **2.3.3. Cultivo *in vitro*.**

La manipulación del tejido vegetal se realiza en esterilidad, en una cámara de flujo horizontal, con medios autoclavados y pinzas y bisturís esterilizados por calor. El material vegetal se mantiene en cámaras de plantas en las condiciones descritas en el apartado 2.3.1.

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para la propagación vegetativa de plantas de tabaco, la transformación, regeneración y propagación de plantas transgénicas, y para los estudios de segregación de la F<sub>1</sub> de las plantas transformadas en medio selectivo.

El medio base utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962). Los medios se esterilizan por autoclavado y los antibióticos, esterilizados mediante filtración, se añaden al medio a 55-60°C. Finalmente, el medio se dispensa en cajas Petri o en contenedores Magenta (Sigma, Madrid, España).

**Medio MS:** 4.3 g/L de mezcla basal de MS (Sigma), 0.1 g/L de mio-inositol, 1 ml/L de vitaminas 1000 x, 30 g/L sacarosa. El pH se ajusta a 5.7 con NaOH 1M. Para medios sólidos, se añaden 6 g/L agar (Difco).

-Vitaminas 1000 x: 0.05 g/L nicotina, 0.005 g/L tiamina, 0.005 g/L piridoxina, 0.005 g/L ácido fólico, 0.0005 g/L biotina, 0.025 g/L glicina.

**MS germinación:** MS sólido. Para seleccionar las semillas de las plantas transgénicas, se añaden 300 mg/L kanamicina.

### **3. EXTRACCIÓN DE DNA.**

#### **3.1. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *E. coli*.**

Los plásmidos de *E. coli* se obtuvieron a partir de 1.5 ml de un cultivo que había crecido durante toda la noche, según los protocolos de lisis alcalina y de lisis por hervido descritos en Sambrook *et al.*, 1989. Ambos protocolos se basan en la rotura de las células, bien con álcali o bien tratándolas con lisozima e hirviéndolas. El DNA se precipita posteriormente con etanol. El sistema de lisis alcalina puede también aplicarse a cultivos de 15 ml ("midipreps"), o de 250 ml ("maxipreps").

También se ha usado un protocolo rápido de obtención de DNA plasmídico de *E. coli* (He *et al.*, 1991), que se resume a continuación. Las células de 1.5-3ml de cultivo se centrifugan y se resuspenden en **tampón TELT**. Se añade fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 (F:C:I), se agita en el vórtex, y se centrifuga unos segundos. La fase acuosa contiene el ADN, que se precipita con etanol.

Para la secuenciación, el DNA obtenido por hervido se limpia pasándolo por una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia), y se precipita con etanol. En algunas ocasiones se utilizó el kit de Wizard Miniprep, de Promega.

**Tampón TELT:** 2.5M LiCl, 50mM Tris pH 8, 4% Tritón X-100, 62.5 mM EDTA.

### 3.2. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *A. tumefaciens*.

Se inocula una colonia de *A. tumefaciens* en 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado en un matraz de 50 ml y se incuba a 28 °C durante 24 h con agitación vigorosa.

Se recogen por centrifugación las células de 3 ml de cultivo en un tubo Eppendorf. Las minipreparaciones de DNA plasmídico se llevan a cabo mediante el método de lisis alcalina descrito para *E. coli*, con la única salvedad de que las células han de incubarse con lisozima durante 15-30 min a temperatura ambiente y con agitación, para la digestión de la pared celular.

### 3.3. OBTENCIÓN DE DNA DE FAGOS.

- Se incuban las bacterias hospedadoras Y1090 en LB Amp100 durante toda la noche.
- Se inoculan 100µl de este cultivo en 100 ml de LB, y se incuba hasta que su D.O.<sub>600</sub> llegue a 0.3.
- Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 10 min, y se resuspenden en el volumen adecuado de 20mM de MgSO<sub>4</sub> para obtener una D.O.<sub>600</sub> de 1.
- Se mezclan 0.5 ml de células con 10-100 µl de fagos (5 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> u.f.c.). La mezcla se incuba a 37°C durante 30 min., y se añade a 40ml de LB.
- Tras incubar en un matraz de 250 ml a 37°C y con fuerte agitación durante toda la noche, la lisis de las bacterias debe apreciarse claramente.
- El cultivo se transfiere a un tubo de centrifuga con 100µl de cloroformo, y se mezcla bien. Se añaden 370 µl de **solución nucleasa** y se mantiene 30 min a 37°C.
- A continuación, se añaden 2.1g de NaCl, se mezcla a temperatura ambiente hasta disolverlo, y se centrifuga a 7000 rpm durante 20 min.
- El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo con 3.7 g de PEG-6000. Una vez disuelto el PEG, se incuba durante 1 hora a 4°C con agitación.
- Se centrifuga nuevamente a 7000 rpm durante 20 min a 4°C. El precipitado contiene los fagos, que se resuspenden en 0.5 ml de **tampón SM** con 50µg/ml de RNasaA, y se transfiere a un tubo Eppendorf. Se incuba a 37°C 10 min.
- Se añaden 0.5 ml de cloroformo, se mezcla y se centrifuga durante 5 min a 15000 rpm.
- Al sobrenadante se le añaden 20µl de EDTA 0.5M, 10µl de SDS 10% y 2.5µl de proteinasa K (10mg/ml), y se incuba a 65°C durante 30 min.
- Se extrae con F:C:I , y dos veces con cloroformo:isoamílico (24:1).

- El DNA se precipita con dos volúmenes de etanol 100%, y se mantiene a 4°C 30 min. Se centrifuga, se lava con etanol al 70%, se seca, y se resuspende en 200  $\mu$ l de **tampón TE** o de agua.

**Solución nucleasa (1 ml):** 0.5ml glicerol, 10 $\mu$ l NaAc 3M, 5 mg DNAsal, 5 mg RNAsaA

**Tampón SM:** 20mM Tris HCl (7.4), 100mM NaCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>.

**Tampón TE:** 10mM Tris, 1mM EDTA. El pH se ajusta a 7.5-8.0

### 3.4. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO DE HONGOS.

El DNA genómico de las diferentes especies de *Trichoderma* y *Gliocladium* se obtuvo según describen Murray y Thomson, 1980, con algunas modificaciones.

- Los micelios obtenidos como se describe en el apartado 2.2.2. se trituran en N<sub>2</sub> líquido con un mortero hasta obtener un fino polvo.

- A 3 ó 4 g de micelio triturado se le añaden aproximadamente 30 ml de Tris HCl 0.2M pH 8.0, y 10-15 ml de SDS 0.5%. La mezcla se agita suavemente con una mosca a 4°C durante 30 min.

- Se centrifuga 10 min a 4°C y 10000 rpm.

- Se añade al sobrenadante 1 volumen de F:C:I, y se agita suavemente.

- Se centrifuga a 15000 rpm y 4°C durante 5 min.

- Nuevamente, se recoge el sobrenadante, y se trata con un volumen de cloroformo:isoamílico 24:1 (C:I), se agita suavemente, y se vuelve a centrifugar en las condiciones anteriores.

- La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo que contiene RNAsaA, de manera que la concentración final sea de 1 $\mu$ g/ml. Se incuba durante 1h a 37°C.

- Se extrae con F:C:I y con C:I.

- Se recoge la fase acuosa, y el DNA se precipita con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y 1 volumen de isopropanol (ó 2 de etanol 100%).

- Tras incubar a -20°C al menos 2 horas, el DNA se recoge por centrifugación durante 5 min a 15000 rpm y 4°C.

- El precipitado se lava bien con etanol 70%, se seca y se resuspende en 500 $\mu$ l de TE.

- La concentración del DNA en soluciones se estima tras la medida de la absorbancia de la muestra a 260 nm, asumiendo que cada unidad de densidad óptica equivale a 50 mg/ml de ADN.

### 3.4. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO DE PLANTAS.

Se siguió el método descrito por Rogers y Bendich (1985), basado en el uso del detergente CTAB (cetil trietil amonio bromuro). En presencia de altas concentraciones de sal (0.7 M), los ácidos nucleicos forman complejos solubles y estables con el CTAB; al bajar la concentración por debajo de 0.4 M NaCl, los ácidos nucleicos precipitan dejando la mayoría de los polisacáridos en solución. El CTAB se elimina fácilmente dada su solubilidad en etanol. El protocolo que se detalla es una modificación adaptada para la obtención de minipreparaciones de DNA genómico de plantas.

- El material recolectado se congela inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se guarda a -80°C hasta su uso.

- El material se tritura en N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Se necesita al menos 200 mg de material.
- Se añade 1 vol de **tampón de extracción** (1 µl/mg de material vegetal) y la mezcla se incuba a 65°C durante 15 min.
- Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 min en la microcentrífuga a temperatura ambiente.
- El sobrenadante se extrae dos veces con 1 volumen de C:I, centrifugando en las condiciones anteriores.
- Se homogeneiza con un vol de **tampón de precipitación**. El DNA genómico precipita al incubar durante al menos 30' a temperatura ambiente.
- Se centrifuga en las condiciones anteriores, y se resuspende el precipitado en 500 µl de CsCl 1 M con 10 µg de RNAsa A.
- El DNA se precipita con 1 ml de etanol absoluto durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifuga, y el precipitado se lava con etanol al 70% y se resuspende en 50-200 µl de agua ó 0.1xTE. Las muestras se almacenan a 4°C.

**Tampón de extracción:** 2% CTAB (p/v), 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP (p/v), pH 8. Se disuelve calentando, se autoclava y se mantiene a temperatura ambiente.

**Tampón de precipitación:** 1% CTAB (p/v), 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% 2-β-mercaptoetanol, pH 8. Se prepara igual que el anterior, salvo que el β-mercaptoetanol se añade justo antes de usar.

## 4. EXTRACCIÓN DE RNA.

### 4.1. OBTENCIÓN DE RNA DE *Trichoderma*.

El RNA total de *Trichoderma* se obtuvo según se describe en Wadsworth *et al.*, 1988, con algunas modificaciones. Todas las soluciones, salvo el tampón de extracción, deben tratarse durante al menos 12h con DEPC 0.1% y autoclavarse. Es necesario el uso de guantes y material estéril durante todo el proceso.

- El micelio se recoge como se describe en el apartado 2.2.2., y se tritura en N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino.
- En un tubo de centrifuga de 30 ml se añaden, por cada gramo de polvo, 2.5 ml de **tampón de extracción**. La mezcla se agita bien hasta obtener una pasta homogénea.
- Se añade un volumen de F:C:I, y se agita nuevamente.
- Se centrifuga a 9000 rpm y 4°C durante 15-20 min.
- La fase acuosa se fenoliza dos veces más en las condiciones anteriores.
- Se añade un volumen de C:I, y se centrifuga de nuevo.
- Se recoge con cuidado la fase acuosa, que se pasa a un tubo Córex, y se añade 1 volumen de LiCl 6M. Se mantiene a 4°C al menos una hora (mejor durante toda la noche).
- Se centrifuga a 9000 rpm y 4°C durante 30 min.
- El precipitado, que contiene el RNA, se resuspende en un volumen de LiCl 3M, y se centrifuga de nuevo.
- Se añaden 400µl de AcNa 0.3 M, pH 5.8, se resuspende el precipitado y se calienta a 55°C durante 10 min. Se pasa a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Inmediatamente, se añade 1ml de etanol frío, y se incuba a -80°C durante 15 min.
- Se centrifuga 15 min a 4°C. El precipitado se seca y se disuelve a 55°C en 50 µl de agua.
- El RNA se almacena a -80°C hasta su análisis.



- La concentración de RNA se estima en el espectrofotómetro, asumiendo que cada unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 mg/ml de RNA. Es conveniente visualizar una alícuota de 1 ó 2  $\mu$ l en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

**Tampón de extracción** : 25 mM NaCitrato pH 7.0, 4 M isotiocianato de guanidinio, 1.5% (p/v) Na-lauril-sarcosina, 100 mM b-mercaptoetanol (7  $\mu$ l/ml de solución comercial 14M antes de usar). Se esteriliza por filtración y se mantiene a 4°C.

## 4.2. OBTENCIÓN DE RNA DE PLANTAS.

Para extraer el RNA total de tabaco, se recogen 300-500mg del material vegetal que se desea analizar, se sumergen en N<sub>2</sub> líquido, y se trituran en un mortero. 200 mg son suficientes para obtener 50 $\mu$ g de RNA. El protocolo que se sigue es el mismo que se ha descrito para *Trichoderma*, pero se efectúa en tubos Eppendorf (al menos 2 tubos por planta), y las centrifugaciones tienen lugar en una microcentrífuga refrigerada a 14000 rpm.

## 5. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR.

### 5.1. PCR A PARTIR DE FAGOS.

La técnica de PCR permite conocer en unas horas el tamaño de los insertos que contienen los fagos aislados de una genoteca de cDNA. Los fagos se someten a la amplificación del inserto para así descartar aquellos cuyo tamaño no se corresponde con el estimado para el gen que se busca.

El protocolo que se ha seguido en este trabajo es el siguiente:

- En un tubo Eppendorf de 500 $\mu$ l se mezclan:
  - 1 $\mu$ l de fago desnaturalizado (10 min a 70°C)
  - 1 $\mu$ l (3 ng) de **cebador  $\lambda$ gt11 directo** (Promega)
  - 1 $\mu$ l (3 ng) de **cebador  $\lambda$ gt11 inverso** (Promega)
  - 1 $\mu$ l **tampón PCR 10x**
  - 4 $\mu$ l agua
- Se incuba a 95°C durante 10 min para asegurar la completa desnaturalización del DNA.
- Se añade 1 $\mu$ l de dNTPs 2.5mM y 1 $\mu$ l de Taq polimerasa (1U/ $\mu$ l), y se cubre con aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.
- Se llevan a cabo 30 ciclos de amplificación:
  - 30 s a 95°C (desnaturalización)
  - 1 min a 57°C (apareamiento)
  - 1 min a 72°C (polimerización del DNA)
- Se incuba a 72°C durante 5 min más para completar la polimerización de todas las moléculas de DNA.
- El producto de la PCR se mezcla con TAE 1x, se elimina el aceite mineral, y se analiza en un gel de agarosa.

**Cebador  $\lambda$ gt11 directo:** 5' GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCCG 3'

**Cebador  $\lambda$ gt11 inverso:** 5' TTGACACCAGACCAACTGGTAATG 3'

**Tampón PCR 10x:** 500mM KCl, 100mM Tris HCl (8.3), 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatina.

## 5.2. PCR A PARTIR DE BACTERIAS.

Las bacterias que contienen un plásmido pueden ser también sometidas a la técnica de PCR para averiguar en unas horas el tamaño del inserto que portan. De este modo, se puede analizar un gran número de colonias a la vez, eficaz y rápidamente. Los cebadores que se han utilizado en este trabajo son las secuencias de M13 directa e inversa, que flanquean el sitio de clonación múltiple de los plásmidos pSK y pGEM-T. Si bien las condiciones de amplificación del DNA son las mismas que las de la PCR de fagos, la preparación de la muestra es diferente. Se mezclan en un tubo de 500 $\mu$ l:

1 $\mu$ l (3 ng) de **cebador M13 directo** (Promega)

1 $\mu$ l (3 ng) de **cebador M13 inverso** (Promega)

1 $\mu$ l tampón PCR 10x

5 $\mu$ l agua

A esta solución se añade una mínima cantidad de la colonia de la bacteria que se desea analizar. Se incuba a 95°C durante 10 min para lisar la bacteria y desnaturalizar el DNA, se añaden los nucleótidos, la Taq polimerasa y el aceite mineral, y se continúa con la reacción de amplificación.

**Cebador M13 directo:** 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

**Cebador M13 inverso:** 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

## 5.3. PCR A PARTIR DE DNA GENÓMICO DE *T. harzianum*.

Con la técnica de PCR es posible clonar genes de proteínas de secuencia parcialmente conocida. Para ello, es necesario diseñar oligonucleótidos degenerados que se correspondan con las secuencias de aminoácidos, y usarlos como cebadores en reacciones de amplificación sobre DNA genómico. El producto de la PCR se comprueba por secuenciación y se usa como sonda para escrutar el gen buscado en una genoteca de cDNA.

### 5.3.1. Diseño de los oligonucleótidos.

Los cebadores para la amplificación se diseñaron según las normas descritas en Sambrook *et al.*, 1989, y con ayuda del programa "Backtranslate" que se incluye en el paquete GCG (Devreux *et al.*, 1984).

A partir de las secuencias de aminoácidos conocidas de la proteína se deducen las secuencias de nucleótidos que pueden codificarlas. Entre ellas, se escogen las zonas menos degeneradas (es decir, que permiten menos cambios de nucleótidos), procurando que la zona 3' sea rica en C y G. Si en una posición pueden encontrarse cualquiera de las cuatro bases, se introduce una inosina (I), que aparee parcialmente con cualquiera de los cuatro nucleótidos; si puede estar ocupada por C o T, se elige la T.

### 5.3.2. Reacción de amplificación.

Las condiciones de la PCR fueron variando hasta que se obtuvo una banda clara y específica, como se explica en *Resultados*. Una reacción típica es la siguiente:

- En un tubo Eppendorf de 500  $\mu$ l, se mezcla:
  - 1  $\mu$ l DNA de *T. harzianum* (50ng/ $\mu$ l)
  - 1  $\mu$ l tampón PCR 10x
  - 1  $\mu$ l (100 pmol) oligonucleótido "sentido"(\*)
  - 1  $\mu$ l (100 pmol) oligonucleótido "antisentido"(\*)
  - 4  $\mu$ l agua

(\*): Los oligonucleótidos "sentido" y "antisentido" se corresponden con las cadenas codificante y no codificante, respectivamente, del DNA molde.

- El DNA se desnaturaliza por completo calentando a 95°C durante 15 min.
- A continuación se añaden la enzima (1U de Taq polimerasa), los nucleótidos (1 $\mu$ l de dNTPs 2.5mM) y el aceite mineral (40-50  $\mu$ l).
- La reacción de amplificación se repite 30 veces:
  - 1 min a 95°C (desnaturalización)
  - 1 min a 60°C (alineamiento)
  - 2 min a 72°C (polimerización)
- Se mantiene, en el último ciclo, 5 min más a 72°C.

## 6. MANIPULACIÓN DE DNA.

### 6.1. VECTORES.

La genoteca de cDNA de *Trichoderma harzianum* CECT2413 estaba construida en el bacteriófago Igt11 (Young y Davis, 1983).

El plásmido pBluescript II SK (+) (pSK+, Stratagene) se ha utilizado para la clonación y secuenciación de los fragmentos delecionados, así como para la obtención de DNA de cadena sencilla a partir del origen de replicación del fago f1.

El plásmido pGEM-T (Promega) se ha utilizado para la clonación de productos de PCR. Procede del vector pGEM-5Zf(+) (Promega) cortado con EcoRV, al que se ha añadido dos timidinas en los extremos 3'. De este modo se consigue una eficaz clonación de productos de PCR, ya que, a menudo, las polimerasas termoestables introducen sendas adenosinas en los extremos 3' del DNA que están sintetizando.

El plásmido pBI221 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) contiene el cassette con el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), el gen *Gus* y el terminador de la nopalina sintetasa (NOS) de *A. tumefaciens*, clonados en el plásmido pUC19. Este plásmido se ha utilizado para clonar, sustituyendo al gen *Gus*, el cDNA que se deseaba expresar constitutivamente en plantas. Luego, el cassette entero (promotor-cDNA-terminador) se subclona en pBin19, y se transfiere a plantas de tabaco *via A. tumefaciens*.

El vector binario pBin19 (Bevan, 1984) contiene el origen de replicación bacteriano RK2, el gen de la nopalina sintetasa, que confiere la resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas, y las regiones Ti de movilización de DNA necesarias para la transformación de plantas de tabaco con *A. tumefaciens*. En este vector se clonaron los genes de hidrolasas de *Trichoderma* para la posterior transformación estable de plantas de tabaco.

El plásmido pGEX-2T (Pharmacia Biotech, Barcelona, España) contiene, bajo el control del promotor ptac (inducible por IPTG, ver apartado 17.1), la secuencia del gen de la glutatión-S-transferasa (GST). Ésta acaba en una secuencia de reconocimiento de la proteasa trombina, y en un sitio de clonación múltiple. Se ha usado para la expresión heteróloga de proteínas en bacterias.

## **6.2. RESTRICCIÓN**

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Boehringer Mannheim (Barcelona, España) y Pharmacia. Las reacciones se realizan siguiendo las condiciones recomendadas por los fabricantes, en un volumen de 20-40  $\mu$ l y con 1-5 U/ $\mu$ g DNA durante 1-4 h.

Para las digestiones dobles, si no existe un tampón compatible para ambas enzimas, se digiere primero con una, se precipita el DNA con etanol, y a continuación se realiza la segunda digestión. Otra opción consiste en realizar primero la digestión con la enzima que requiera menor concentración de sales y, una vez concluida, ajustar la concentración salina para el segundo tratamiento.

## **6.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA.**

Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de PCR u originados por digestión de plásmidos se separan en geles de agarosa, se recortan, y se aíslan mediante el método de Gene-clean® (Bio101, La Jolla, CA, USA), que se basa en la solubilización de la agarosa en NaI y la unión del DNA a una matriz de perlas de vidrio.

## **6.4. GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS.**

### **6.4.1. Relleno de extremos 5' prominentes.**

La polimerasa Klenow es capaz de rellenar extremos 5' prominentes gracias a su actividad DNA-polimerasa 5'→3'. Tras la digestión con la enzima de restricción adecuada, se añaden 1  $\mu$ l de dNTPs 0.5mM y 1  $\mu$ l de Klenow (2U), y se incuba a 30°C durante 15 min. La enzima se inactiva por calentamiento a 75°C durante 10 min.

### **6.4.2. Degradación de extremos 3' prominentes.**

La T4 DNA polimerasa, gracias a su actividad exonucleasa 3'→5', degrada los extremos 3' prominentes generados por algunas enzimas de restricción.

En un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , se mezcla el DNA, 2  $\mu\text{l}$  de **tampón T4 DNA polimerasa**, 6  $\mu\text{l}$  de dNTPs 0.5 mM y 1  $\mu\text{l}$  (1U) de enzima. La incubación tiene lugar a 30°C durante 15 min.

**Tampón T4 DNA polimerasa 10x:** 50mM Tris HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 7mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, pH 7.5.

### 6.5. DESFOSFORILACIÓN DE PLÁSMIDOS.

Los plásmidos linearizados pueden autoligarse, perdiéndose de este modo eficacia en las ligaciones. Para evitarlo, es conveniente desfosforilar los plásmidos antes de efectuar la ligación.

- Tras la digestión del DNA (30 $\mu\text{l}$ ), se añade
  - 4 $\mu\text{l}$  **tampón AP 10x**
  - 1 $\mu\text{l}$  (1U) fosfatasa alcalina
  - 5 $\mu\text{l}$  agua
- Se incuba a 37°C durante 30min. La enzima se inactiva 10 min a 75°C.

**Tampón AP 10x:** 0.5 mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH 8.5.

### 6.6. LIGACIONES.

Se usaron las mismas condiciones para las ligaciones de fragmentos de DNA de extremos romos que para las de extremos cohesivos. Una reacción estándar se describe a continuación.

- En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se mezclan:
  - 1 $\mu\text{l}$  (50 ng) DNA plásmido desfosforilado
  - 7 $\mu\text{l}$  (100-300 ng) DNA inserto
  - 1 $\mu\text{l}$  **tampón T4 DNA ligasa 10x**
  - 1 $\mu\text{l}$  (1U) T4 DNA ligasa

- Se incuba durante 2-3 horas a temperatura ambiente ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ), o bien a 15°C toda la noche.

**Tampón T4 DNA ligasa 10x:** 660mM TrisHCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 10mM ATP, pH 7.5.

### 6.7. DELECCIONES SERIADAS DE DNA.

Para la delección de regiones específicas de DNA se ha utilizado el kit "Nested deletion kit" de Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión controlada del DNA por la Exonucleasa III (ExoIII) permite generar a partir de un plásmido original una serie de versiones progresivamente más cortas del inserto que contiene.

La ExoIII tiene una actividad 3' exonucleasa sobre DNA bicatenario, es decir, comenzando por un extremo romo o 5'-prominente. No es activa, sin embargo, en extremos 3'-prominentes.

Con estas características, es posible obtener el sustrato conveniente para la digestión unidireccional de la ExoIII. Primero se corta con una enzima de restricción que origine 3'-prominentes, para crear así un extremo insensible a la nucleasa. Es, pues, de suma importancia asegurarse bien de este corte, ya que protege la integridad del plásmido. El extremo susceptible a la nucleasa se consigue digiriendo con una enzima que origine extremos romos o 5'-prominentes.

A continuación se incuba con la ExoIII durante diferentes periodos de tiempo. La velocidad de la enzima se puede modular modificando los parámetros de temperatura y concentración de sales durante la incubación, tal como se especifica en el kit. La digestión de las regiones unicasenarias que genera la ExoIII se consigue con el tratamiento con la nucleasa S1. Los extremos romos que se obtienen se pueden ligar con la T4 ligasa, y usarse para transformar *E. coli*. El tamaño del inserto que portan las colonias transformantes se analizan por PCR o por minipreparaciones de DNA plasmídico y digestión.

## 6.8. SECUENCIACIÓN DEL DNA.

Se siguió el método de Sanger de los dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). La síntesis se inicia a partir de un oligonucleótido complementario a una de las secuencias del fago M13 que flanquean el sitio de clonación de pSK, o bien a una secuencia conocida cercana a la que se desea conocer. La reacción tiene lugar en presencia de la polimerasa de DNA y de los cuatro dideoxinucleótidos, uno de ellos marcados con <sup>35</sup>S. Se llevan a cabo cuatro reacciones, cada una de ellas con una proporción de cada uno de los dideoxinucleótidos, que detienen la síntesis. De este modo, se consigue en cada reacción una serie de poblaciones de DNA de diversos tamaños, que se resuelven en paralelo en un gel de acrilamida. Las bandas de la autorradiografía indican la presencia de un desoxinucleótido.

En este trabajo se ha utilizado el kit de secuenciación de *Sequenase® Version 2.0* (United States Biochem, USB, Cleveland, Ohio, USA), y seguido las instrucciones del fabricante, excepto en la desnaturalización de la muestra, que se detalla a continuación.

### 6.8.1. Desnaturalización de la muestra.

Para desnaturalizar el DNA bicatenario de partida, se siguió el método descrito por Hsiao (1991).

- Al DNA bicatenario se le añade 1  $\mu$ l del oligonucleótido de secuenciación (10 ng/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de NaOH 1N, y se incuba a 37°C durante 10 min.

- A continuación, se neutraliza con 1  $\mu$ l de HCl 1N, se mezcla bien, y se añaden 2  $\mu$ l de **tampón de reacción 5x**.

- Se incuba a 37°C durante 5 min, y se continúa con el protocolo detallado en el kit *Sequenase® Version 2.0*.

**Tampón de reacción 5x:** 200 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl.

### 6.8.2. Geles de secuenciación.

Los productos de las reacciones se separan en geles de poliacrilamida de secuencia de 0.2 y 0.4 mm de grosor, que se preparan según la receta siguiente:

	Gel al: 4%	6%
Urea	20 g	20 g
<b>TBE 5x</b>	8 ml	8 ml
Acrilamida/bisacrilamida (38%/2%)	4 ml	6 ml
H <sub>2</sub> O	12 ml	10 ml
persulfato amónico 10%	0.2 ml	0.2 ml

Se disuelve a 45°C y el volumen se ajusta con agua a 40 ml. Es conveniente filtrar con filtro Millipore (0.45  $\mu$ m) y desgasificar. A continuación, se añaden 20  $\mu$ l de TEMED (Pharmacia) inmediatamente antes de llenar las placas que, previamente, han sido tratadas con etanol y acetona, y una de ellas, silanizada. A continuación, se montan las placas con los separadores y, tras el llenado con la mezcla del gel, se coloca el peine. Los pocillos se forman con peines de dientes de tiburón (Pharmacia). El gel polimeriza completamente al cabo de 30-40 min. Tras la corrida en tampón TBE 1x a 2500-3000V, el gel se adsorbe a una hoja de papel Whatman 3 MM y se fija en una mezcla de acético/metanol/agua (10:10:80). Posteriormente, se seca en un secador de vacío (Bio-Rad, Madrid, España) durante 1 h a 80°C y se expone a películas Agfa-Curix durante 24-48 h a temperatura ambiente.

**TBE 5x:** 54 g/L Tris base, 27.5g/L ácido bórico, 10 mM EDTA pH 8.0.

Las secuencias obtenidas se trataron con el paquete de análisis del Genetics Computer Group (GCG), de la Universidad de Wisconsin (Devreux *et al.*, 1984).

## 7. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Para la realización de las construcciones psCHIT42 (ver apartado 2.2. de Resultados) ha sido necesario crear artificialmente dianas de restricción. Para ello, se ha recurrido a las técnicas de mutagénesis *in vitro* y la mutación mediante PCR.

### 7.1. MUTAGÉNESIS *in vitro*.

Se ha realizado según las instrucciones del kit de Bio-Rad Muta-Gene® Phagemid *in vitro* Mutagenesis. Brevemente, la técnica consiste en sintetizar *in vitro*, a partir de un DNA molde uncatenario, una segunda cadena, utilizando la T4 DNA polimerasa y, como cebador, un oligonucleótido complementario a la región que se desea alterar y que contiene la mutación deseada. La DNA ligasa sella la nueva cadena, y se obtiene de este modo un plásmido híbrido cadena original-cadena mutada que, en las sucesivas rondas de replicación, originarán poblaciones de plásmidos con la copia original y con la mutación.

El uso de la estirpe CJ236 disminuye de manera eficaz la proporción de copias originales que se rescatan tras la mutagénesis *in vitro*. Sus mutaciones *dut* y *ung* permiten obtener cadenas de DNA con gran cantidad de uracilos en lugar de timinas. Gracias a la inactivación de la enzima

dUTPasa a causa de la mutación *dut*, la estirpe presenta altos niveles intracelulares de dUTP, que se incorporan a las cadenas nacientes de DNA. La mutación *ung*, inactivación de la uracil-N-glicosidasa, impide la degradación de estas cadenas de DNA portadoras de U.

El producto de la mutagénesis *in vitro*, sintetizado en presencia de dTTP, es una doble cadena de DNA en la que la cadena original presenta uracilos, y la mutada, no. Al transformar con este plásmido híbrido una estirpe con una uracil-N-glicosidasa activa, la cadena con U será destruida con gran eficacia, y se replicará mayoritariamente la cadena que contiene la mutación.

### 7.1.1. Obtención de DNA monocatenario.

Se utiliza el fago "helper" M13K07, derivado de M13 capaz de replicar fásmidos contenidos en las bacterias que infecta (pSK en nuestro caso) a partir del origen de replicación vírico *f1*, y encapsidarlos en forma de DNA de una cadena.

- Se transforman células CJ236 con el plásmido que contiene el inserto que se desea mutagenizar.

- Se inocula una colonia transformante en 2 ml de medio LB Cam30, y se deja crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. La estirpe CJ236 tiene un plásmido F' que le confiere resistencia a cloranfenicol, y que contiene la información necesaria para fabricar *pili*.

- Se inocula 1 ml del cultivo anterior en 50 ml de medio **2xYT** con Amp100, y se incuba a 37°C hasta que el cultivo alcanza una DO<sub>600</sub> de 0.3, que corresponde aproximadamente a una concentración de 10<sup>7</sup> células por ml.

- A 30 ml de ese cultivo se le añade la cantidad apropiada del fago M13K07 para que la multiplicidad de infección sea de 20. El cultivo se mantiene en agitación durante una hora, durante la cual se produce la adsorción de las partículas fágicas a los *pili* bacterianos.

- Se añade 35  $\mu$ l de una solución de kanamicina a 100 mg/ml, y se continúa la incubación de 4 a 6 horas más. La kanamicina selecciona las bacterias que han sido infectadas por el fago, que porta un gen de resistencia a dicho antibiótico.

- Se centrifuga el cultivo a 12000 rpm y 4°C durante 15 min, y se recoge el sobrenadante, que contiene las partículas fágicas. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones, y se filtra.

- El sobrenadante se trata con 150  $\mu$ g de ARNasaA durante 30 min a temperatura ambiente.

- Los fagos precipitan al añadir 1/4 del volumen de una solución 3.5 M acetato amónico, 20% PEG-6000. Se mantiene 30 min en hielo.

- Se centrifuga nuevamente en las condiciones anteriores.

- El precipitado se resuspende en 200  $\mu$ l de una solución 300 mM de NaCl, 100 mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0. Se pasa a un tubo Eppendorf, se mantiene 30 min en hielo, y se centrifuga durante 2 min en microcentrífuga para eliminar partículas insolubles.

- El DNA uncatenario se extrae de los fagos tratando dos veces con sendos volúmenes de fenol, una con fenol-cloroformo-isoamílico, y varias con cloroformo-isoamílico. A continuación, se precipita con 1/10 del volumen total de acetato amónico 7.8 M y 2.5 volúmenes de etanol. Se mantiene a -80°C durante 10-15 min, y se centrifuga a 15000rpm y 4°C durante 15 min. Tras lavar suavemente con etanol al 90% y secar, se resuspende en 20  $\mu$ l de tampón TE.

- Se analiza una alícuota en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. En presencia de EtBr, el DNA bicatenario está superenrollado, y migra más lentamente que el uncatenario.



### 7.1.2. Síntesis de la cadena mutante.

Para realizar la reacción de síntesis, es necesario primero fosforilar el oligonucleótido portador de la mutación que se desea introducir. La reacción de fosforilación es la siguiente:

- Se mezclan, en un tubo eppendorf,

Oligo (20 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
<b>Tampón kinasa 5 x</b>	6 $\mu$ l
10 mM ATP	1.5 $\mu$ l
Agua	11.5 $\mu$ l
Polinucleótido kinasa (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

- Se incuba a 37°C durante 45 min.
- La enzima se inactiva calentando a 65°C durante 10 min.

El apareamiento del oligonucleótido fosforilado con el DNA unicatenario se realiza como se describe a continuación:

- Se mezclan:

Oligo fosforilado	2 $\mu$ l
DNA monocatenario	0.2 $\mu$ g
<b>Tampón de apareamiento 10 x</b>	1 $\mu$ l
Agua	Hasta 10 $\mu$ l

- Se coloca a 80°C, y se deja enfriar lentamente hasta 30°C, tras de lo cual se mantiene en hielo.

La reacción de síntesis de la nueva cadena la lleva a cabo la enzima T4 DNA polimerasa, según la reacción siguiente:

- Se añade a la mezcla anterior:

<b>Tampón de síntesis 10 x</b>	1 $\mu$ l
T4 DNA polimerasa(*)	2 $\mu$ l
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ l

(\*) La T4 DNA polimerasa (3U/ $\mu$ l) se diluye 1:5 en tampón de síntesis 1x.

- Se mantiene 5 min en hielo, 5 min a temperatura ambiente, y 90 min a 37°C.
- Se añaden 40 $\mu$ l de T10E10, y se enfría.
- La calidad de la preparación se analiza en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

El DNA bicatenario obtenido se utiliza para transformar *E. coli* DH5a u otra estirpe sin las mutaciones *dut* y *ung.*. Las colonias transformantes se analizan por digestión y secuenciación de los plásmidos que contienen.

**Tampón kinasa 5x:** 100 mM TrisHCl (8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT.

**Tampón de apareamiento 10x:** 20 mM TrisHCl (7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl.

**Tampón de síntesis 10x:** 0.4 mM cada dNTP, 0.75 mM ATP, 17.5 mM TrisHCl (7.5), 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT.

**T<sub>10</sub>E<sub>10</sub>:** 10 mM TrisHCl (8.0), 10 mM EDTA (8.0).

## 7.2. MUTAGÉNESIS POR PCR.

Es también posible realizar mutagénesis dirigida mediante PCR. El principal inconveniente de esta técnica la baja fidelidad en la síntesis que posee la Taq polimerasa (tasa de error de aproximadamente  $2.6 \cdot 10^{-5}$ ). Sin embargo, cuando los fragmentos de DNA que se desean mutar son lo suficientemente pequeños para ser secuenciados fácilmente, resulta la opción más rápida y eficaz.

Se realiza una reacción de PCR sobre el plásmido que contiene el inserto que se desea mutagenizar, utilizando un oligo que contiene la mutación como uno de los cebadores de la síntesis. Una reacción típica es la siguiente:

- 1  $\mu$ l DNA ( 20ng/ $\mu$ l aproximadamente)
- 1  $\mu$ l tampón PCR 10x
- 1  $\mu$ l cebador M13 (directo o reverso, según convenga)
- 1  $\mu$ l oligonucleótido con la mutación (10ng/ $\mu$ l)
- 4  $\mu$ l agua
- 1  $\mu$ l Taq polimerasa (1U/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l dNTPs 2.5 mM

Los ciclos de desnaturalización, apareamiento y síntesis tienen lugar tal como se ha descrito en el apartado 5, siendo la temperatura de apareamiento dependiente de los oligos utilizados.

El producto de la PCR, que contiene la mutación, se subclona en el plásmido pGEM-T, y el plásmido resultante se introduce en bacterias. La presencia de la mutación se confirma por secuenciación, así como la ausencia de otras mutaciones no deseadas.

## 8. ANÁLISIS SOUTHERN.

### 8.1. PREPARACIÓN DEL FILTRO.

#### 8.1.1. Digestión de DNA genómico y electroforesis.

El DNA genómico de hongos filamentosos y plantas se obtiene y cuantifica como se describe en los apartados 3.3 y 3.4, respectivamente.

- Alícuotas de 5-10  $\mu$ g (hongos) o 15  $\mu$ g (plantas) de DNA se digieren con la enzima de restricción correspondiente en dos fases de 3 horas, cada una con una carga de 1  $\mu$ l de enzima.

- Los fragmentos originados se separan por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% + BrEt, a bajo voltaje (1V/cm), durante 18-24h. Es conveniente, una vez cargadas las muestras,

aplicar 100 V durante los 5 primeros minutos para asegurar la entrada de todos los fragmentos de DNA en el gel.

- Una vez finalizada la electroforesis, el DNA del gel se visualiza con luz UV y se marca la posición de pocillos y marcadores de peso molecular pinchando el gel con una aguja impregnada en tinta china. La eficacia de la digestión se corresponde con la aparición de bandas repetitivas.

- El gel, a continuación, se baña sucesivamente en:

HCl 25 mM (hidroliza fragmentos de alto peso molecular)

**Southern I** (solución desnaturizante)

**Southern II** (solución neutralizante)

**SSC 20x** (tampón de transferencia)

Todos los tratamientos se llevan a cabo a temperatura ambiente y durante 15 min.

**Southern I:** 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

**Southern II:** 1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl.

**SSC 20x:** 3 M NaCl, 0.3 M Na<sub>3</sub>Citrato·2H<sub>2</sub>O, el pH se ajusta a 7 con HCl 1M.

### 8.1.2. Transferencia del DNA a membrana

Tras los tratamientos anteriores, el DNA está preparado para ser transferido a un filtro de nylon (Hybond-N, Amersham) por capilaridad. Para ello, el gel se coloca sobre un puente de papel de filtro Whatman 3MM, cuyos extremos se sumergen en tampón de transferencia, SSC 20x. Sobre el gel se colocan sucesivamente una membrana de nylon del tamaño del gel, tres papeles Whatman 3MM, y una pila de papel absorbente. Sobre el conjunto, se coloca un peso de unos 500g. Una vez transcurridas 6 o más horas, el filtro se seca a temperatura ambiente durante 30 min, y el DNA se fija covalentemente al filtro por iluminación con luz ultravioleta en un "cross-linker" CL-1000 (UVP, San Gabriel, USA), según las indicaciones del fabricante.

### 8.1.3. Filtros de productos de PCR.

Los productos de PCR se separan en geles de agarosa al 0.8-1.2%, que se procesan como se ha descrito en el apartado 8.1.1., salvo que el baño en HCl 0.25M no es necesario.

El DNA se transfiere y fija tal como se describe anteriormente.

## 8.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS.

- Los filtros se colocan en el horno de hibridación (Hybaid™ micro-4), con 5-15 ml de solución de hibridación, y se incuban durante al menos 1h a 42°C para bloquear los sitios de unión inespecífica presentes en las membranas.

- La sonda se prepara con 50-100 ng de DNA, y según las instrucciones del kit de marcaje radiactivo de Boehringer o Pharmacia. Ambos protocolos se basan en el alineamiento de la sonda con cebadores aleatorios o "random primer". La polimerasa Klenow utiliza estos cebadores como inicio de la síntesis de la cadena complementaria en presencia de dATP, dTTP, dGTP y [<sup>32</sup>P]dCTP. Se usan 10-50 μCi totales de radiactividad, según el experimento. Los nucleótidos

no incorporados se separan por cromatografía en columnas de Sephadex G-50. La sonda se desnaturaliza hirviéndola durante 10 min e incubándola inmediatamente en hielo.

- El fragmento de DNA marcado radiactivamente y desnaturalizado se añade a la solución de hibridación, donde se siguen incubando los filtros durante 12-18 horas a 42°C. Tras la hibridación, se retira la sonda y se lavan varias veces las membranas con las soluciones de lavado I y II a 65°C. Los filtros hibridados se exponen a películas Agfa Curix con pantallas intensificadoras a -80°C.

**Solución de hibridación:** SSPE 5x, 0.2% ficoll 400, 0.2% polivinilpirrolidona, 0.1% SDS, 50% formamida.

**Solución de lavado I:** 2 x SSPE, 1% SDS

**Solución de lavado II:** 0.2 x SSPE, 0.1% SDS

**SSPE 20x:** 175 g/L NaCl, 27.6 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 7.4 g/L EDTA; pH 7.4.

**Nota:** En experimentos de hibridación de menor especificidad, el porcentaje de formamida usado en la solución de hibridación es del 35%, y los lavados se realizan a menor temperatura, típicamente a temperatura ambiente.

## 9. ANÁLISIS NORTHERN.

### 9.1. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE RNA Y TRANSFERENCIA A FILTRO.

El análisis electroforético de RNA total se ha realizado en geles de agarosa en **tampón northern 10x** con formaldehído. Posteriormente, se han incorporado las modificaciones descritas por Tsang *et al.*, 1993, que incluye el formaldehído tanto en el gel como en el tampón de corrida a una concentración final de 0.22M. Con esta variación se consigue una corrida más uniforme del ARN a través del gel y por consiguiente una mejor resolución final.

Las muestras de RNA se preparan de la siguiente forma:

- En un tubo Eppendorf de 1.5ml, se mezclan:
  - 4.5  $\mu$ l RNA
  - 2  $\mu$ l de tampón northern 10x
  - 3.5  $\mu$  de formaldehído
  - 10  $\mu$ l de formamida
- Se calienta a 65°C durante 15 min.
- Se añade 3  $\mu$ l de **tampón de carga 10x**.

Los geles de agarosa se preparan al 1.2%, en tampón northern 1x y con 0.22M de formaldehído. Es aconsejable trabajar en la campana de extracción. La electroforesis se lleva a cabo en tampón northern 1x y 0.22M de formaldehído a 90 V.

Tras la electroforesis, el gel se lava durante 5-10 min en agua destilada para eliminar parte del formaldehído, y se equilibra durante 15 min en el tampón de transferencia, SSC 20x. El RNA se transfiere por capilaridad a un filtro de nylon durante al menos 8h, y se fija luego a la

membrana por iluminación con luz ultravioleta, tal como se describe en el apartado 8.1.2. para el DNA.

Una vez transferido a la membrana de nylon y fijado, el ARN puede ser visualizado por tinción reversible (Herrin y Schmidt, 1988). Esto permite verificar la calidad de la transferencia y comparar la cantidad de ARN existente en cada carril. La membrana se incuba en **solución de tinción** hasta que las bandas de ARN ribosómico se hacen visibles (unos 3 min). El exceso de tinción se elimina con agua destilada hasta que las bandas se dibujan nítidamente sobre un fondo claro. La tinción se retira lavando la membrana con SSPE 0.2x, SDS 1% durante 15 min a temperatura ambiente.

**Tampón northern 10x** : 0.2 M MOPS, 80 mM AcNa, 10 mM EDTA. Se ajusta a pH 7 con NaOH.

**Tampón de carga 10x**: 50% glicerol, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.25% azul de bromofenol.

**Solución de tinción**: 0.02% azul de metileno en acetato sódico 0.3 M (pH 5.5)

## 9.2. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS.

La hibridación y lavados de la membrana se realizan en las condiciones descritas en el apartado 8.2.

## 10. HIBRIDACIÓN DE COLONIAS

El método de Grünstein & Hogness (Sambrook *et al.*, 1989) permite analizar múltiples colonias por hibridación con la sonda correspondiente *in situ*.

- Se colocan filtros de nylon o nitrocelulosa sobre cajas con LB, y se marcan pinchando con una aguja y rotulando en ese punto la caja. Filtros y cajas se numeran.

- Las colonias se inoculan ordenadamente sobre los filtros, y se hacen réplicas en cajas sin filtro. Se incuban a 37°C toda la noche.

- Una vez han crecido las colonias sobre los filtros, éstos se separan con cuidado de las cajas, y se incuban sucesivamente, con las colonias hacia arriba, sobre papeles 3MM empapados con las siguientes soluciones:

SDS 10%	10 min
Southern I	5 min
Southern II	5 min
SSC 2x	5 min

- Se dejan secar los filtros a temperatura ambiente, y se fijan a 80°C con vacío durante 1h, si se trata de filtros de nitrocelulosa, o con luz ultravioleta, si se trata de filtros de nylon.

Marcaje de la sonda, hibridación y lavados se llevan a cabo según se ha descrito en el apartado 8.2.

## 11. ESCRUTINIO DE GENOTECAS.

- Se inoculan células de *E. coli* Y1090 en 3ml de LB Amp100, y se incuban a 37°C durante toda la noche.

- Se mezclan 4000-5000 fagos recombinantes con 200µl de bacterias, y se incuban a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrida esta fase de adsorción de los fagos a las bacterias, se mezclan con 5ml de **agarosa de cobertera** a 42°C, y se vierten en cajas de LB de 135 mm de diámetro.

- Las cajas se incuban durante toda la noche a 37°C. De este modo, se consiguen entre 4000 y 5000 calvas de lisis por caja.

- Los fagos se transfieren a filtros de nitrocelulosa (Schleicher&Schuell) colocando el filtro sobre el césped bacteriano durante 3 min. Los filtros se marcan perforándolos con una aguja y señalando los orificios en la caja.

- Los filtros se colocan sucesivamente sobre papeles *Whatmann* 3MM empapados en las siguientes soluciones:

Southern I	10 min
Southern II	10 min
SSPE 2x	10 min

- Se secan al aire durante 30 min.

- El DNA se fija al filtro tras un tratamiento de 2 h a 80°C con vacío.

- La prehibridación, la hibridación y los lavados se llevan a cabo como se describe en el apartado 8.2., con la única salvedad de que la prehibridación se realiza en un volumen grande (al menos 50ml por cada filtro), para eliminar restos celulares.

- Los fagos obtenidos en un primer escrutinio se aíslan en sucesivas rondas de hibridación, en cajas de 90 mm de diámetro, sembrando los fagos a una concentración tal que no confluyan los halos. Se considera que un fago está aislado cuando todas las calvas que aparecen en una caja hibridan con la sonda.

**Agarosa de cobertera:** medio LB con 7g/L de agar.

## 12. TRANSFORMACION DE BACTERIAS.

### 12.1. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

#### 12.1.1. Preparación de células competentes.

- La estirpe elegida se incuba en LB sólido a 37°C durante una noche.

- Se inocula una colonia aislada en 5 ml de **medio Y** y se incuba a 37°C hasta que la D.O.600 del cultivo sea 0.3 (unas 2 horas). Estas células se inoculan en 150 ml de medio Y precalentado a 37°C, y se incuban con fuerte agitación hasta que la D.O.600 llegue a 0.5 (aproximadamente 2h y media).

- El cultivo se transfiere a un tubo de centrifuga y se enfría en hielo. Se centrifuga a 2500 rpm y 4°C durante 10 min.

- Las células se resuspenden en **TFB1** frío, se mantienen 15 min a 4°C, y se vuelven a centrifugar en las condiciones anteriores.

- Se resuspende suavemente el precipitado en 10 ml de **TFB2** frío, se reparten en alícuotas de 200  $\mu$ l, se congelan en N<sub>2</sub> líquido, y se almacenan a -80°C.

**Medio Y:** 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levaduras, 15mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM KCl. El pH debe ajustarse a 7.6 con KOH.

**TFB1:** 100mM RbCl, 50mM MnCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 30mM KAc, 10mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 15%(p/v) glicerol. Se disuelven en el orden indicado. El pH se ajusta a 5.8 con acético 0.2M. Se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C.

**TFB2:** 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 15%(p/v) glicerol. El pH se ajusta a 6.8 con NaOH. Se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C.

### **12.1.2. Transformación de *E. coli*.**

- Se mezclan 200  $\mu$ l de células competentes previamente descongeladas con un volumen máximo de 20 $\mu$ l de DNA (al menos 10ng de DNA).

- Se mantienen a 4°C durante 30 min.

- Se incuban durante 45 segundos a 42°C, pasándolas rápidamente a hielo.

- Se añaden 800 mL de LB y se incuban las células a 37°C durante 45-60 min con agitación.

- Se siembran en el medio de selección adecuado, y se colocan a 37°C.

### **12.2. TRANSFORMACIÓN DE *A. tumefaciens*.**

Se ha utilizado el método de congelación-descongelación descrito por Holsters *et al.* (1987) y posteriormente modificado por Höfgen y Willmitzer (1988).

#### **12.2.1. Preparación de células competentes.**

- Las bacterias se inoculan en LB Str250 sólido, y se mantienen a 28-30°C durante 2 días.

- Se inocula una colonia aislada en 200mL LB Str250 y se incuba durante 36 horas a 28°C con fuerte agitación.

- Se centrifugan las células a 3000 rpm y 4°C durante 20 min. El precipitado se lava con 10 ml de TE (7.5) frío.

- El precipitado se resuspende finalmente en 20 ml de LB frío y se hacen alícuotas de 200  $\mu$ l, que se sumergen inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se guardan a -80°C.

#### **12.2.2. Transformación de *A. tumefaciens*.**

- Se mezcla un alícuota de células competentes con 0.5-1  $\mu$ g de ADN, y se incuba en hielo durante 5 min.

- Se congela en N<sub>2</sub> líquido (unos 5 min), y se incuba a 37°C durante 5-10 min.

- Se añade 1 ml de LB, y se transfiere todo a un tubo de 10 ml para facilitar la aireación de las células. Se incuba a 28°C durante 2-4 horas, con fuerte agitación.

- Se extienden en el medio sólido adecuado, típicamente LB+Kan100+Str250, y se incuba a 28-30°C. Las colonias transformantes aparecen al cabo de 2-4 días.

### 12.3.3. Comprobación de *A. tumefaciens*.

La naturaleza de *A. tumefaciens* se puede verificar fácilmente con el sistema de Benedict.

- Se pican las colonias en cajas de **lactosa-agar**.
- Cuando las colonias han crecido, se añade la **solución de Benedict**. Las colonias de *A. tumefaciens* desarrollan a su alrededor un halo amarillo.

**Lactosa agar:** 1 g/L extracto de levadura, 10 g/L lactosa, 15 g/L agar.

**Solución de Benedict: I.** 1.73 g CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, disueltos en 10ml de agua caliente. **II.** 17.3 g citrato de sodio, 10 g carbonato de sodio anhidro, disueltos en 60-70 ml de H<sub>2</sub>O caliente. Se enfría la solución I y se añade a la II. El volumen final se ajusta a 100 ml.

## 13. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE TABACO.

Para la transformación estable de plantas de tabaco, se ha aprovechado la capacidad de la bacteria *A. tumefaciens* de transferir fragmentos de DNA.

### 13.1. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *A. tumefaciens*.

Una colonia de *A. tumefaciens* transformada con el plásmido que contenga la construcción que se desea introducir en plantas se inocula en 10 ml de medio LB con Kan100 y Str250, en un matraz de 250 ml. Se incuba a 28°C durante 24 h con agitación vigorosa. Las células se centrifugan a 3500 rpm y 4°C durante 20 min y se resuspenden en 10 ml de medio LB sin antibióticos y en condiciones de máxima esterilidad. Las células así preparadas se deben mantener en frío.

### 13.2. TRANSFORMACIÓN DE DISCOS DE HOJAS DE TABACO.

Se requieren plantas silvestres de tabaco mantenidas *in vitro* en condiciones de esterilidad. Las hojas de plantas jóvenes (4-6 semanas) se cortan en trozos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, eliminando el nervio central, y se colocan con el envés hacia arriba y sin sumergir en cajas Petri con 20 ml de **MS de cocultivación**, en el que se han inoculado previamente 100-200 ml de *A. tumefaciens* preparadas según el apartado anterior. La herida de la planta conlleva el establecimiento de una transducción de señales mediante la cual se activan las funciones necesarias para la movilización e integración del T-DNA.

Por cada transformación se cocultivan unos 100 discos de hojas (10-15 discos/placa) a 25°C y en oscuridad durante 2 días. Es importante que todas las manipulaciones se realicen con pinzas planas (Millipore) y que se coloquen los discos sobre el medio de cocultivación conforme se cortan.

**MS de cocultivación:** Medio MS líquido sin vitaminas.



### 13.3. AISLAMIENTO Y REGENERACIÓN DE PLANTAS DE TABACO TRANSFORMADAS.

Tras la cocultivación, las secciones de hoja se lavan en agua destilada estéril para eliminar el exceso de bacterias y se secan ligeramente sobre papel de filtro estéril. Los discos de hojas se colocan sobre medio de formación de brotes, MSS, con el haz en contacto con el medio, y se incuban en una cámara de cultivo iluminada hasta la formación de callos y posteriormente de brotes de plantas (15-30 días).

Los brotes de plantas bien formados y verdes se cortan y se trasplantan a contenedores Magenta con medio MS de enraizamiento. Se consideran falsos transformantes aquellos incapaces de enraizar en medio selectivo.

Las plantas se mantienen en la cámara de cultivo *in vitro* hasta que alcanzan unos 10-15 cm de altura, momento en el que el ápice se multiplica vegetativamente en MS y el resto de la planta se trasplanta a macetas con tierra. Las plantas se recubren inicialmente con bolsas de plástico transparente para acondicionarlas al cambio de humedad.

**MSS (regeneración de brotes):** Medio MS sólido; 50  $\mu$ L de ácido naftalenacético (NAA) (2 mg/ml en NaOH 1N), 500  $\mu$ L benzilaminopurina (BAP) (2 mg/ml en NaOH 1N), 100 mg/L kanamicina y 250 mg/L carbenicilina o cefotaxima.

**MS enraizamiento (selección de los brotes transgénicos):** Medio MS sólido, 100 mg/L kanamicina y 250 mg/L carbenicilina o cefotaxina.

## 14. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

### 14.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE PLANTAS.

#### 14.1.1. Extracción de proteínas totales.

- Se tritura el material en N<sub>2</sub> líquido hasta convertirlo en polvo fino.
- Se añade 1 volumen de **tampón de extracción Laemmli 2x** y se homogeneiza.
- La mezcla se calienta a 95°C durante 10 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm 15 minutos para retirar el material insoluble.

Si se desean eliminar los pigmentos presentes en muestras de hojas, tallos y flores, se procede de la siguiente manera:

- Las proteínas en tampón Laemmli 2x se precipitan con al menos 3 volúmenes de TCA al 10% en acetona fría, con 0.07%  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Se incuban durante 45 minutos a -20°C y se centrifuga 15 minutos a 13000 rpm.
- El sedimento se lava varias veces con acetona fría con 0.07%  $\beta$ -mercaptoetanol, incubando a -20°C y centrifugando como antes. Se lava hasta retirar los pigmentos del precipitado.
- El sedimento se seca muy bien y se resuspende en tampón Laemmli 1x, se hierve a 95°C durante 5 minutos y se centrifuga para retirar la fracción insoluble.

Para los ensayos de actividad se requieren proteínas activas, es decir, en forma nativa. Al material triturado se le añade un volumen de **tampón fosfato**, se homogeneiza, y se centrifuga

a 15000 rpm y 4°C durante 10 min. El sobrenadante contiene las proteínas solubles sin desnaturalizar.

**Tampón de extracción Laemmli:** 0.0625 M TrisHCl pH 6.8, 10% glicerol, SDS 2%, 5% 2-mercaptoetanol, 0.05% (p/v) Azul de bromofenol.

**Tampón fosfato:** tampón fosfato-KOH 70mM, pH 6.0

#### 14.1.2. Extracción de proteínas extracelulares de hojas.

Se ha utilizado el método de extracción descrito por Verwoerd *et al.*, 1995, y levemente modificado en nuestro laboratorio (ver figura 5).

- Se cortan las hojas a tiras de 1 cm de grosor, se colocan encima de tiras del mismo tamaño de parafilm, y se enrollan.

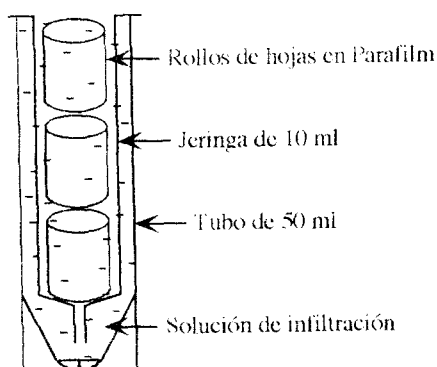
- Los rollos se meten cuidadosamente en una jeringa de 10 ml que contiene la **solución de infiltración**. La jeringa con los rollos de plantas se coloca a su vez en un tubo de 50 ml lleno de la misma solución, y éste, a su vez, se coloca dentro del sistema de vacío. Se aplica vacío a baja potencia dos veces durante 10 min. De este modo, los espacios intercelulares se infiltran con la solución.

- Se centrifuga el tubo con la jeringa durante 5 min a 1000 rpm en una centrifuga con rotor de ángulo variable. El líquido que se obtiene se descarta, pues es el que quedó entre las hojas y el parafilm.

- Las proteínas extracelulares se eluyen centrifugando el tubo con la jeringa durante 10 min a 1500 rpm.

- Se resuelven los extractos en un gel de acrilamida que se tiñe con azul de Coomassie. La calidad de la extracción se determina por la práctica ausencia en ella de la enzima intracelular Rubisco, de dos subunidades de 55 y 12 kDa, mayoritarias en extractos totales de hoja.

**Solución de infiltración:** 1mM Hepes, pH 6.3, 50 mM NaCl



**Figura 5. Extracción de proteínas extracelulares de hojas.**

## 14.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de las proteínas contenidas en una solución se lleva a cabo con dos métodos diferentes, según la composición del tampón en el que van disueltas.

### 13.2.1. Método de Bradford.

El método de Bradford (1976) es muy rápido y sencillo, pero no aplicable a muestras proteicas disueltas en tampones que contengan detergentes (SDS, Tritón X-100 ó NP-40) a concentraciones superiores al 0.2%. No se puede utilizar, pues, para medir la concentración de proteínas obtenidas en tampón Laemmli.

A 1.5 ml de **solución Bradford** se añaden 5-10  $\mu$ l de muestra, se incuba durante 5-30 min y se mide la absorbancia a 595 nm. Se construye paralelamente una recta patrón con 0, 1, 5, 10 y 15  $\mu$ g de BSA. Los valores de absorbancia de las muestras obtenidos se extrapolan a concentración de proteínas en la recta patrón.

**Solución Bradford:** Se diluye la solución Bradford 5x (Bio-Rad) en agua destilada 1:5.

### 13.2.2. Método de Lowry modificado.

Este método permite estimar la concentración de proteínas en soluciones con detergentes. El método, inicialmente descrito por Lowry (1951), fue posteriormente modificado por Bensadoun y Weinstein (1976).

- A 600  $\mu$ l de agua se añaden 5-10  $\mu$ l de muestra.
- Se añaden 5  $\mu$ l de deoxicolato sódico 2%, se agita la mezcla y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente.
- Las proteínas se precipitan con 200  $\mu$ l de TCA 24%. Se mezcla bien y se centrifuga a 6500 rpm, 30 min a temperatura ambiente.
- El precipitado se resuspende en 1.4 ml de **reactivo D**. Inmediatamente se añaden 100  $\mu$ l de Folin-Ciocalteus (Merck, Darmstadt, Alemania) diluído 1:1 en agua.
- Tras incubar 45 min en oscuridad, se mide la absorbancia a 660 nm. La concentración de proteína se extrapola a partir de los valores obtenidos para la recta patrón que se lleva en paralelo.

**Reactivo C:** 20 g  $\text{CO}_3\text{Na}$ . 10 ml de Tartrato NaK 2%, 6.2 ml NaOH 16 N. Primero se disuelve el  $\text{CO}_3\text{Na}$  en 900 ml de agua, y luego se añade el resto de los componentes y se completa hasta 1L.

**Reactivo D:** 50 ml de reactivo C, 0.5 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1.4%. Se prepara inmediatamente antes de su uso.

## 14.3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.

Se realiza en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según el método descrito por Laemmli (1970). La separación de proteínas se lleva a cabo en un sistema discontinuo consistente en un gel de apilamiento y en un gel de separación. Las muestras se resuelven a voltaje constante de 200V hasta que el azul de bromofenol alcanza el borde inferior del gel (aproximadamente 45 min).

**Gel de apilamiento:** 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, A/B (3.8% acrilamida, 0.2% bisacrilamida), 0.05% APS, 0.1% TEMED.

**Gel de separación:** 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, A/B (29.2% acrilamida, 0.8% bisacrilamida) hasta el porcentaje adecuado, 0.05% APS, 0.05% TEMED.

**Tampón de migración:** 25 mM Tris, 194 mM glicina, 0.1% SDS.

#### **14.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE.**

Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se bañan durante 30 minutos en una solución de Azul de Coomassie (Coomassie brillant blue R-250), al 0.25% en 50% de metanol y 10% de ácido acético a 50-60°C. Los geles se destiñen en 5% metanol, 7.5% ácido acético.

#### **15. ANÁLISIS WESTERN.**

El método, originalmente descrito por Towbin (1979), permite caracterizar los antígenos correspondientes a un anticuerpo y determinar la presencia y cantidad relativa de éstos en mezclas complejas.

Los extractos proteicos son en primer lugar resueltos por electroforesis y transferidos a filtros de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF, o Immobilon® -Amersham, Buckinghamshire, UK-). La membrana se incuba con los anticuerpos y se lava. Finalmente, los anticuerpos que se han unido específicamente a su antígeno se detectan sobre el filtro. Los sistemas de detección de anticuerpos son variados; en este trabajo se han usado anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina.

##### **15.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS.**

###### **15.1.1. Obtención del suero anti-CHIT42.**

Muestras de 200µg de proteína CHIT42 purificada a homogeneidad (De la Cruz *et al.*, 1992) se emulsionan con un volumen de adyuvante completo de Freund, y se inyectan subcutáneamente en distintas zonas del cuerpo de un conejo albino macho de raza neozelandesa, que pesa unos 2 kg al inicio del tratamiento. Previamente a la primera inyección, se extrae sangre, que servirá para preparar el suero preinmune. Con intervalos de quince días, se vuelven a inyectar dos muestras con la misma cantidad de proteína, esta vez en adyuvante incompleto de Freund. Tras quince y treinta días después de la última inyección, se extraen de 20 a 40 ml de sangre.

La sangre, a la que se añade heparina, se mantiene toda la noche a 4°C, tras lo cual se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se reparte en alícuotas de 1ml y se congela a -80°C. Estos sobrenadantes han constituido los sueros anti-CHIT42.

### 15.1.2. Purificación por afinidad de anticuerpos con el antígeno inmovilizado en membranas de nitrocelulosa o de PVDF.

- En primer lugar se resuelven unos 700 mg de extracto enriquecido en proteína de fusión (ver apartado 17) por electroforesis monodimensional en acrilamida.
- Las proteínas se transfieren como se describe en el apartado 15.2, y la membrana se tiñe con solución 0.5% Ponceau S en 0.1% ácido acético. Se corta la banda correspondiente a la proteína de fusión.
- Se bloquean los sitios de unión inespecífica de proteína con TBS+5% leche desnatada en polvo+0.2% Tween20 durante 2 horas.
- Se incuba el filtro con el antisuero diluido 50 veces en solución de bloqueo, en un volumen final de 3 ml, durante toda la noche a 4°C.
- Las tiras se lavan 4 veces durante 15 minutos con PBS.
- El anticuerpo unido se eluye incubando durante 5 minutos en 1.5 ml de 0.2M glicina pH 2.8, 0.2% gelatina.
- Las tiras de nitrocelulosa o de Immobilon<sup>®</sup> se retiran, y se neutraliza inmediatamente la solución con 0.1 volúmenes de solución 1M Tris (9.0). Se comprueba con papel indicador que el pH sea neutro y se añaden 0.1 volúmenes de PBS 10x. Se hacen alícuotas y se guarda a -20°C.

### 15.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA.

Para la transferencia de proteínas a membrana se ha utilizado un aparato de transferencia semi-seca de la firma comercial LKB.

- Tras la electroforesis, se equilibra el gel en el **tampón de transferencia** durante 15 minutos a temperatura ambiente. La membrana de PVDF ha de ser hidratada con un tratamiento de unos segundos en metanol y al menos 5min en agua. Luego, se equilibra al igual que el gel en el tampón de transferencia.
- La transferencia se realiza colocando el gel en contacto con la membrana de PVDF, de manera que la membrana esté en la cara del gel más cercana al cátodo. Se colocan 6 papeles de Whatman 3MM del tamaño del gel, empapados en tampón de transferencia, a cada lado del gel.
- Se aplica un amperaje de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante 90 minutos.
- Las proteínas transferidas se pueden visualizar en el filtro tiñendo durante 3 minutos con la **solución de Ponceau S**, y destiñendo posteriormente con agua o con **TBS**.

**Tampón de transferencia:** 39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS y 20% metanol

**Solución de Ponceau S:** 0.5% Ponceau S en 1% de ácido acético.

**TBS 5x (Tris buffered saline):** 40 g/L NaCl, 1 g/L KCl, 15 g/L Tris-base. El pH se ajusta a 8 con HCl.

### 15.3. INMUNODETECCIÓN CON ANTICUERPOS CONJUGADOS A FOSFATASA ALCALINA.

- La membrana se incuba con **solución de bloqueo** 1-2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

- Una vez bloqueada, se incuba con el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. La dilución apropiada del anticuerpo se determina previamente por titulación del mismo.

- Se lava el filtro 4 veces durante 10-15 minutos con **solución de lavado**.

- La membrana se incuba durante 2 horas con el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina) diluido, según aconseja el fabricante, en solución de bloqueo

- Se lava como se indica anteriormente.

- Para el revelado por reacción de la fosfatasa alcalina, se equilibra la membrana en **tampón de fosfatasa alcalina** durante 5 minutos. Se añade la **solución cromogénica** hasta que las bandas se hacen claramente visibles. La reacción se detiene lavando con abundante agua destilada, y la membrana se fotografía o se guarda en oscuridad.

**Solución de bloqueo:** 5% p/v leche desnatada en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé) en TBS 1x.

**Solución de lavado:** 0.05% Tween-20 en TBS 1x.

**Tampón de fosfatasa alcalina:** 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

**Solución cromogénica:** Se prepara inmediatamente antes de su uso añadiendo 66 ml de solución NBT y 33 ml de solución BCIP a 10 ml de tampón de fosfatasa alcalina.

**Solución NBT:** Se disuelven 50 mg NBT (Nitro-blue tetrazolium, Sigma) 1ml de dimetilformamida al 70%. Se guarda a -20°C.

**Solución BCIP:** Se disuelven 50 mg de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) en 1 ml de dimetilformamida 100%. Se guarda a -20° C.

### 16. TISSUE-PRINTING.

Esta técnica consiste en la adsorción de proteínas a un filtro de nitrocelulosa o de PVDF por presión de secciones de tejido sobre éste. De este modo, se obtiene una imagen fiel de la superficie del corte (Cassab y Varner, 1987). Posteriormente, es posible detectar una proteína específica mediante el uso de un anticuerpo.

#### 16.1. PREPARACIÓN DEL FILTRO.

- La membrana de nitrocelulosa se trata durante 30 min con CaCl<sub>2</sub> 0.2M, a temperatura ambiente, y se deja secar durante al menos 15 min al aire.

- A continuación, se colocan seis papeles Watman 1MM, una hoja de papel, y, sobre éste, la nitrocelulosa.

- Se cortan con una cuchilla secciones del material que se desea analizar, se secan ligeramente apoyando sobre papel de filtro, y se presionan suavemente sobre el filtro de nitrocelulosa o PVDF durante 20-30 seg.

- La membrana se tiñe con Ponceau S para elegir las impresiones más homogéneas.

## **16.2. INMUNODETECCIÓN.**

Para detectar en los cortes una proteína, la membrana se procesa tal como se ha descrito en el apartado 15.3. para los análisis western, pero se utiliza el anticuerpo purificado por afinidad (ver apdo. 15.2.2).

## **17. OBTENCIÓN DE PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-CHIT42.**

### **17.1. Descripción del sistema de expresión heteróloga**

Los vectores de expresión de la serie pGEX están diseñados para la expresión en bacterias de polipéptidos como fusiones con la proteína glutatión-S-transferasa (GST). La clonación se efectúa en dianas situadas tras la secuencia codificante de la GST, y precedidas por un sitio específico de proteasas. Para ello existen versiones del vector con diferentes fases de lectura en los sitios de clonación y sitios específicos para proteasas diferentes (trombina y factor Xa).

Los vectores pGEX tienen el gen de la GST bajo el control de un promotor ptac inducible químicamente y un gen lac I<sup>q</sup> para dar independencia del huésped al plásmido. El represor lac, producto del gen lac I<sup>q</sup>, se une al promotor ptac, reprimiendo la expresión de la proteína de fusión GST. Cuando se añade IPTG, la expresión a partir del promotor ptac se desreprime, y se expresa la proteína híbrida.

### **17.2. Obtención y análisis de los transformantes**

- El fragmento de DNA que codifica el péptido que queremos expresar se clona en el vector de la serie pGEX apropiado, se transforman células competentes de *E. coli*, y se seleccionan los transformantes en cajas con LB+Amp100. Las cajas se incuban de 12 a 15 horas a 37°C.

- Se inoculan tubos con 2 ml de LB+Amp100 con colonias transformantes. Como control se inocula una colonia transformante del vector pGEX. Se incuban durante 3-5 horas a 37°C con agitación.

- Se añade IPTG a concentraciones finales de 0.1 a 100 mM a 1ml del cultivo para inducir la expresión de las proteínas. Se continúa la incubación durante 1-2 horas.

- Se centrifugan los cultivos durante 20 seg a 13000 rpm, y el sedimento se resuspende en tampón Laemmli. Se hierva 10 minutos a 95°C, se centrifuga y el sobrenadante se analiza en un gel de poliacrilamida. Se tiñen las proteínas con azul de Coomassie y se eligen aquellos transformantes que expresen la proteína tras la inducción con IPTG.

### **17.3. Purificación de la proteína de fusión GST-CHIT42.**

Las proteínas de fusión se purifican a partir de lisados celulares por adsorción en columnas de sefarosa 4B-glutatión (Pharmacia) y posterior elución con glutatión reducido. La purificación se realiza, por tanto, en condiciones no desnaturizantes; además de esta ventaja, el sistema permite obtener el polipéptido deseado libre de la GST mediante la digestión de la proteína de fusión con la proteasa correspondiente.

- Se inocula una colonia transformante en 100 ml LB+Amp100 y se incuba 12-15 horas a 37°C con agitación.
- Se diluye el cultivo 1:10 en 1 litro de LB+Amp100, repartiendo el volumen en dos matraces de 2 litros, y se incuba 1 hora a 37°C.
- Se añade IPTG a una concentración final de 1mM y se continúa la incubación durante 3-7 horas.
- El cultivo se centrifuga 10 minutos a 5500 rpm para sedimentar las células. El sedimento se resuspende en 40 ml de PBS frío.
- Las células se lisan usando un sonicador. La sonicación no debe ser muy fuerte, evitando durante el proceso la formación de espuma. La lisis se monitoriza por el cambio de aspecto de la solución, que pasa de tener un color amarillento a grisáceo.
- Se añade Tritón al sonificado hasta una concentración final del 1%, y se mezcla bien con agitación suave durante 30 minutos para ayudar a la solubilización de la proteína.
- Una vez sonicadas, el material insoluble y las células intactas se eliminan por centrifugación a 9500rpm durante 15min, a 4°C. Además de la centrifugación es conveniente filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 mm de Millipore.
- Una vez limpio, se incuba el sobrenadante durante 20 minutos con 2-3 ml de sefarosa 4B-glutación equilibrada en PBS+1% Tritón X-100 (ver nota al final). El proceso que se describe a continuación se puede realizar en columna o en tubo; en el primer caso, se pasan los extractos que se van obteniendo por la columna, y en el segundo, se centrifuga en cada paso la sefarosa a 500 rpm en una centrifuga de mesa.
- Se lava la sefarosa con 10 volúmenes de PBS y se lleva a cabo la digestión con trombina de la proteína unida a la matriz, o bien se eluye la proteína de fusión.
- Para el tratamiento con trombina, se añade 1 volumen de PBS igual al volumen de la sefarosa y 400 unidades de trombina (Sigma) y se incuba 12 horas a 25°C con agitación suave. Se centrifuga, y en el sobrenadante se encuentra la proteína digerida. Para recoger el resto de proteína, se añade un volumen de PBS y se repite el proceso. Este último paso se repite dos veces más, pero sin mezclar las alícuotas hasta ser analizadas.
- Para eluir la proteína de fusión unida a la matriz, se lava la sefarosa con 10 volúmenes de PBS, y se eluye la proteína GST-CHIT42 con 5 volúmenes de una solución recién preparada de Glutación 5mM en Tris-HCl 50 mM pH 8. Mediante este proceso es posible también eluir la proteína GST que queda en la Sefarosa tras el tratamiento con trombina.
- Una vez eluidas las proteínas (sea la de fusión o la GST), se eliminan los restos de glutación libre de la columna lavando con 10 volúmenes de PBS.
- Se trata la sefarosa con 10 volúmenes de 3M NaCl en PBS para retirar cualquier molécula restante.
- Se lava la sefarosa con 10 volúmenes de PBS y 10 volúmenes de etanol 20% y se guarda en esta solución de alcohol a 4°C hasta nuevo uso.

La proteínas GST-CHIT42 y CHIT42 purificadas se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para congelar las proteínas, se añade glicerol hasta una concentración final del 15%, y se almacenan en alícuotas a -80°C.

**Nota:** La sefarosa 4B se conserva en etanol por lo que, para su uso, se debe lavar con 5-10 volúmenes de PBS.



**PBS 10x (Phosphate buffered saline):** 80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14.4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El pH se ajusta a 7.2.

## **18. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

Los experimentos de microscopía electrónica fueron realizados por los Dr. Simona Muccifora y Paolo Gori, de la Universidad de Siena. La técnica consiste en la fijación del material biológico, realización de cortes finos y la detección mediante anticuerpos de la proteína en estudio.

### **18.1. Fijación del material.**

- Las semillas de las plantas transgénicas se siembran en MS Kan300, y las de las plantas control sin transformar, en MS. Al cabo de 2-3 semanas, se toman muestras de hojas de las germinulas.

- Las hojas se fijan con paraformaldehído al 2% en tampón fosfato 0.1M+1.8% sacarosa, a 4°C.

- Al cabo de varias horas, se lavan abundantemente con tampón fosfato a 4°C, y se deshidratan con etanol 100% a 4°C.

- Las muestras se embeben e incluyen en LWR (lowcryl) a -36°C. La resina polimeriza tras un tratamiento con luz ultravioleta.

### **18.2. Tratamiento de las secciones.**

Las muestras se cortan en secciones finas con ayuda del ultramicrotomo, y se tratan según el protocolo siguiente:

- Se incuban durante 10min en PBS.

- Se mantienen en PBS con BSA al 1%, para bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo.

- Tras el bloqueo, las secciones se incuban con el primer anticuerpo en PBS+BSA 1%, convenientemente diluido, durante una noche.

- Se lavan los cortes 3-4 veces en PBS+BSA 1%.

- Se lleva a cabo la incubación con el segundo anticuerpo, conjugado a partículas de oro y diluido convenientemente en PBS+BSA 1%, durante 90 min.

- Se lava la muestra con PBS 3-4 veces, y otras tantas en agua destilada.

- La coloración de contraste se realiza con acetato de uranilo y citrato de plomo, durante el tiempo mínimo para que se visualicen las señales.

Para descartar posibles señales debidas a reacciones cruzadas con el segundo anticuerpo, se llevan a cabo en paralelo tratamientos de las mismas muestras en los que se omite la incubación con el primer anticuerpo.

## 19. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUITINASA DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.

### 19.1. Método de la quitina coloidal.

La actividad quitinasa de los extractos en tampón fosfato de plantas se ha determinado según el método descrito por Boller *et al.*, 1983.

- Se mezclan 200 $\mu$ l de una solución de quitina coloidal, y 500 $\mu$ l de la solución enzimática diluida apropiadamente.

- Se mantiene 1h a 37°C. Durante este tiempo, la endoquitinasa contenida en la mezcla degradará la quitina coloidal, obteniéndose diferentes oligosacáridos solubles de GlcNAc.

- Las muestras se calientan a 100°C durante 7min, para detener la reacción.

- Se centrifuga a 14000rpm durante 5 min.

- Se toman 200 $\mu$ l del sobrenadante, y se pasan a un tubo que contiene 40 $\mu$ l de la **solución de helicasa**, y se mantiene durante 1h a 37°C. La helicasa transforma los oligosacáridos obtenidos en GlcNAc.

La GlcNAc obtenida se determina según el método de Reissig *et al.*, 1955, a partir de 200 $\mu$ l de la mezcla de la reacción con la helicasa.

- A los 200 $\mu$ l de la reacción se le añaden 40 $\mu$ l de borato potásico 0.8M, pH 9.1. Se calienta a 100°C durante 3min.

- A continuación, la mezcla se enfría rápidamente en hielo-agua, y se le añade 1ml de la **solución de PDAB**. Se incuba a 37°C durante 25min.

- Se mide la absorbancia a 585nm. Como patrón, se emplean concentraciones conocidas de GlcNAc de 0 a 1 mg/ml.

- La actividad quitinasa se determina por los  $\mu$ mol de GlcNAc liberados por min y  $\mu$ g de proteína total.

**Solución de helicasa:** 30 mg/ml de helicasa (IBF Biotechnics, Francia).

**Solución de PDAB:** Se disuelven 10g de para-dimetil-aminobenzaldehído en 87.5ml de ácido acético glacial y 12.5ml de HCl 10N. Esta solución concentrada se guarda protegida de la luz a 4°C, y se diluye 10 veces en ácido acético glacial para su uso.

### 19.2. Método de la MeUmbQ.

Un método mucho más sensible para medir la actividad quitinasa de las plantas transgénicas se describe en Kuranda y Robbins (1990). El sustrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-N, N', N''-triacetil quitotriósido (MeUmbQ, Sigma) es hidrolizado por la quitinasa, produciéndose el producto fluorescente metil-umbeliferina (MeUmb), que se detecta en un fluorímetro (ver figura QQ).

- Se mezclan 1 $\mu$ g de proteína total de plantas, en 20 $\mu$ l de tampón fosfato (7.0), con 80  $\mu$ l de la solución de MeUmbQ. Se incuba durante 15 min a 30°C en oscuridad.

- La reacción se detiene añadiendo 2.9 ml de tampón de parada.

- La cantidad de MeUmb liberada se mide en un espectrofotómetro de fluorescencia, ajustado a 350 nm de luz de excitación y 440 nm de emisión. Para la recta patrón, se llevan paralelamente muestras con cantidades de MeUmb entre 0 y 1500 pmol, en los mismos tampones que las muestras de plantas.

- La actividad quitinasa se expresa como pmol de MeUmb liberados por minuto y por  $\mu\text{g}$  de proteína total.

**Solución de MeUmbQ:** 250  $\mu\text{M}$  de MeUmbQ en tampón citrato sódico 0.1 M, pH 3.0

**Tampón de parada:** tampón glicina NaOH 0.5 M, pH 10.4.

## **20. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

### **20.1. ENSAYOS DE RESISTENCIA DE GERMÍNULAS AL HONGO *Rhizoctonia solani*.**

El hongo *R. solani* infecta las raíces de plantas solanáceas, produciendo la enfermedad denominada ¿"podredumbre del cuello de la raíz"?

En este trabajo se han llevado a cabo una serie de experimentos encaminados a determinar la resistencia de las plantas control y transgénicas al ataque de *R. solani*. Se han utilizado para ello plántulas de tabaco de 10-20 días de edad, procurando que todas las utilizadas en un ensayo tuvieran el mismo tamaño (de 0.5 a 1cm de longitud de la parte aérea) y el mismo estado de desarrollo.

#### **20.1.1. Preparación de cajas con *R. solani*.**

- El hongo fitopatógeno se propaga en medio sólido PDA a 25°C. Estos inóculos deben ser regularmente aislados de tejido vegetal infectado para mantener su virulencia.

- Para preparar las cajas, el hongo se cultiva en medio PDB líquido, manteniéndolo durante 4-5 días a 25°C con fuerte agitación. El micelio se recoge por filtración, se lava con agua estéril y se pesa.

- Se mezclan 600mg de micelio con 688ml de agua, y se baten en una batidora durante 30 s a máxima potencia, y otros 30 s a potencia media. La suspensión debe adquirir un aspecto homogéneo.

- A la mezcla homogénea de micelio y agua se le añaden 112 ml de agar 5% a 60°C. Se mezcla todo bien, y se vierte la solución resultante en cajas de Petri, que se mantienen a temperatura ambiente hasta que solidifican. Las cajas se pueden almacenar a 4°C durante una semana.

#### **20.1.2. Infección.**

- Se siembran semillas de plantas sin transformar y plantas transgénicas en MS, y se cultivan durante 10-20 días como se describe en el apartado 2.3.1.

- Las plántulas de tabaco seleccionadas para el ensayo se recogen con pinzas estériles, teniendo mucho cuidado de no dañarlas y de extraer toda la raíz del medio sólido, sin que queden restos de MS en ella.

- Se colocan las plántulas en las cajas con *Rhizoctonia*, y se sumergen con sumo cuidado las raíces en el agar. De este modo, las raíces están en contacto directo con el micelio, favoreciéndose así la infección.

- A lo largo de los siguientes 15-20 días, y cada 3-4 días, se cuenta en cada caja el número de plantas vivas (no infectadas) y muertas (infectadas). En estas condiciones de ensayo, la

infección de las plántulas lleva consigo la rápida maceración de los tejidos y, por consiguiente, la necrosis y muerte de las plantas infectadas.

- Los resultados de las evaluaciones se representan como porcentajes de supervivencia de las plantas.

El proceso completo se esquematiza en la figura 6.

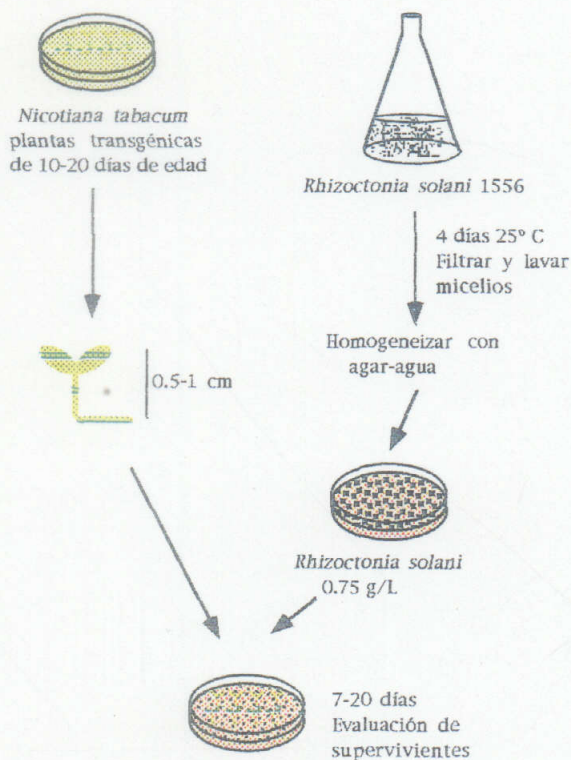


Figura 6: Ensayos de resistencia de plántulas de tabaco a la infección por *R. solani*.

## **RESULTADOS**

## ANTECEDENTES. DATOS PREVIOS.

En nuestro grupo se había aislado una serie de enzimas hidrolíticas a partir de sobrenadantes de cultivos en quitina de *Trichoderma harzianum* CECT 2413. Entre ellas, tres quitinasas fueron purificadas mediante métodos de adsorción a quitina coloidal y separación por cromatofluore: CHIT42, CHIT37 y CHIT33. Sus características más importantes se resumen en la tabla 11.

Parámetro	CHIT42	CHIT37	CHIT33
Peso molecular aparente	42 kDa	37kDa	33kDa
pI	6.2	4.6	7.8
Glicosilación	No	No	No
Temperatura óptima	40-45°C	45-50°C	45-50°C
Km(quitina)	1.0mg/ml	0.5mg/ml	0.3mg/ml
Modo de acción	Endo	Endo	Endo

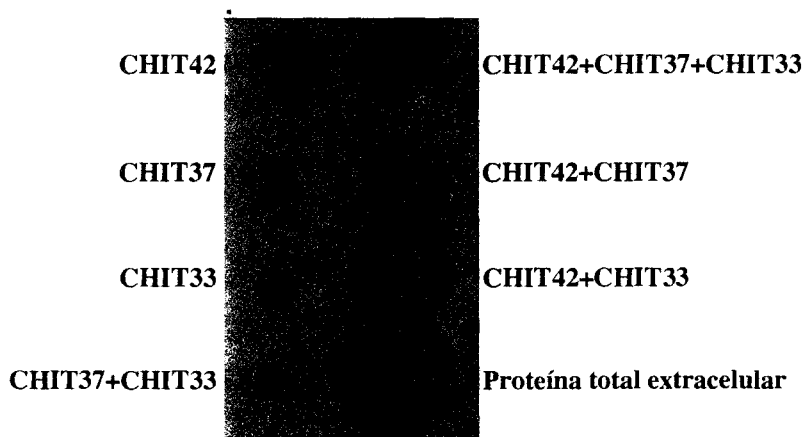
Tabla 11: Resumen de las propiedades de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 (De la Cruz *et al.*, 1992).

Las medidas de los niveles de actividad quitinasa se efectuaron a partir de los sobrenadantes de cultivos del hongo que contenían diferentes fuentes de carbono a concentraciones determinadas (tabla 12).

Fuente de carbono	Actividad quitinasa (mU/mg prot.)
Glucosa 0.1 %	0
Glucosa 2 %	0
Glucosa 10 %	0
Galactosa 2 %	0
Fructosa 2 %	0
Glucosamina 2 %	5
N-acetil-glucosamina 2 %	2
Glicerol 2 %	0
Quitina 1.5 %	25
Quitosán 1 %	0
Paredes de Botrytis 1 %	5
Micelio autoclavado de Gibberella 1 %	23
Micelio autoclavado de Phytophthora 1 %	24
Micelio autoclavado de Rhizoctonia 1 %	17
Micelio autoclavado de Trichoderma 1 %	22

Tabla 12. Resumen de las actividades quitinasa extracelulares en diversas fuentes de carbono. La actividad se midió mediante el método de Reissig. 1 mU equivale a los micromoles del producto (GlcNAc) liberados por minuto de ensayo (De la Cruz *et al.*, 1993).

Por último, se estudió la capacidad de las quitinasas purificadas de degradar paredes celulares del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* CECT 2100. Sólo CHIT42 fue capaz de crear halos de lisis en placas que contenían paredes del fitopatógeno, potenciándose su acción cuando se combinaba con las otras dos quitinasas (figura 7).



**Figura 7: Actividad lítica sobre paredes celulares de *B. cinerea* de las quitinasas CHIT42, CHIT37 y CHIT33.** Se utilizaron 10 $\mu$ g de cada proteína. La proteína total contiene 10 $\mu$ g de un precipitado con sulfato amónico de las proteínas extracelulares presentes en un cultivo en quitina (De la Cruz *et al.*, 1992).

La capacidad de degradar paredes de *Botrytis* de CHIT42 por sí sola, así como el efecto sinérgico que mostraba con otras proteínas, la convertían en un candidato idóneo para los objetivos que se planteaban en el presente trabajo. Por lo tanto, se abordó el estudio del gen *chit42*.

## 1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *chit42*.

### 1.1. AISLAMIENTO DEL cDNA CHIT42 POR PCR.

#### 1.1.1. Diseño de los oligonucleótidos.

La quitinasa de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 CHIT42 purificada (De la Cruz *et al.*, 1992) había sido parcialmente microsecuenciada en nuestro laboratorio. Las secuencias aminoacídicas obtenidas se detallan en la tabla 13.

N-terminal:	ANGYANSVYFTN <sub>x</sub> GIYDR
Péptidos internos:	YADD(S)(W)NDVGTNAYG
	GLGGSMFWEASADKK
	ALGGLDTTQNLLSYPNSK

**Tabla 13.** Secuencias parciales de aminoácidos de la proteína CHIT42 (De la Cruz, 1994). x=aminoácido indeterminado. Entre paréntesis se señalan los aminoácidos más probables en esa posición. Las secuencias utilizadas para diseñar los oligonucleótidos se muestran en **negrita**.

Tras una búsqueda de homología en las bases de datos disponibles, se encontró gran similitud con diversas zonas de la secuencia de aminoácidos de la quitinasa de 40 kDa del hongo micoparásito *Aphanocladium album* (Blaiseau y Lafay, 1992). De este modo, se pudieron localizar los péptidos en la proteína deducida a partir de la secuencia de la quitinasa de *A. album*, y fue posible diseñar oligonucleótidos correspondientes a la secuencia codificante y a la no codificante (sentido y antisentido, respectivamente). A

continuación, se muestran los oligonucleótidos utilizados, obtenidos a partir de las secuencias señaladas en negrita en la tabla 13.

Oligonucleótido sentido: 5' AAT GAT GTI GGI ACI AAT GCI TAT GG3'

Oligonucleótido antisentido : 5' TTT (A/G)TC IGC IGA IGC TTC CCA (A/G)AA CAT3'

Para el diseño de ambos, se siguieron las reglas descritas en el apartado 5.3.1. de *Materiales y Métodos*. Algunas de sus características relevantes se destacan a continuación:

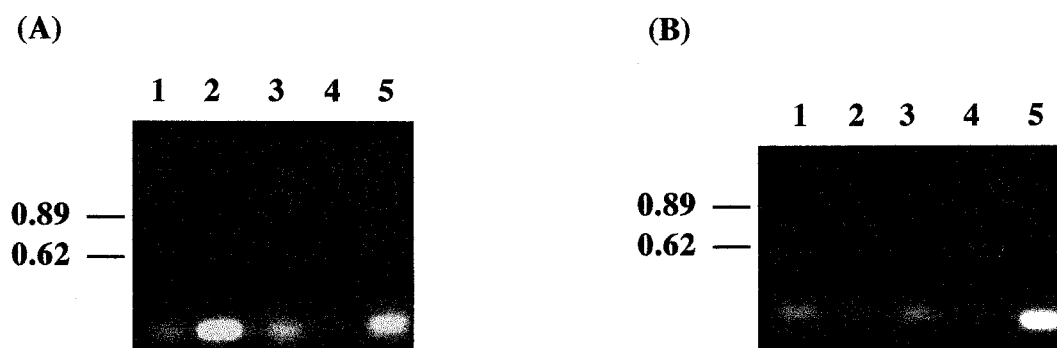
Oligonucleótido	% G+C	Tm (°C)	Longitud. (nucl.)
sentido	34	65	26
antisentido	40	61	27

La Tm (temperatura de fusión) se calculó según la fórmula aproximativa:  $Tm=2(n^{\circ} A+T+I)+3(n^{\circ} G+C)$ .

### 1.1.2. Amplificación por PCR y clonación de una banda específica de DNA.

Las reacciones de PCR fueron realizadas a partir de DNA genómico de *T. harzianum*, como se describe en el apartado 5.3.2. de *Materiales y Métodos*. Para distinguir productos de PCR inespecíficos, todas las reacciones de PCR llevaban diversos controles, que incluían DNA con cada uno de los oligonucleótidos por separado, y los dos oligonucleótidos sin DNA. Además, se ensayaron distintas cantidades relativas de ambos oligonucleótidos en la reacción con DNA.

Inicialmente, se utilizaron condiciones estándar, es decir, temperatura de apareamiento de aproximadamente 10°C menor que la Tm media de los dos oligos. En nuestro caso, esa temperatura inicial era de 55°C. En estas condiciones, se obtuvo una serie de bandas en las reacciones con DNA, que fueron desapareciendo paulatinamente a medida que la temperatura de apareamiento aumentaba, manteniéndose a 60°C una sola banda específica en la reacción con DNA y ambos oligonucleótidos.



**Figura 8: Obtención de una banda específica.** (A). Amplificación por PCR a 55°C (condiciones iniciales). Se observa la aparición de una serie de bandas en los carriles 1 a 3. (B). Amplificación por PCR a 60°C. La banda específica de 800 pb solamente aparece en los carriles 1 y 2. Carriles: 1. 100ng de los dos oligonucleótidos; 2. 100ng del



oligonucleótido sentido y 150' del antisentido; 3. 100ng del oligonucleótido sentido; 4. 100ng del oligonucleótido antisentido; 5. Reacción sin DNA molde. A la derecha se señalan los pesos moleculares (kDa) del patrón (fago I digerido con HaeIII).

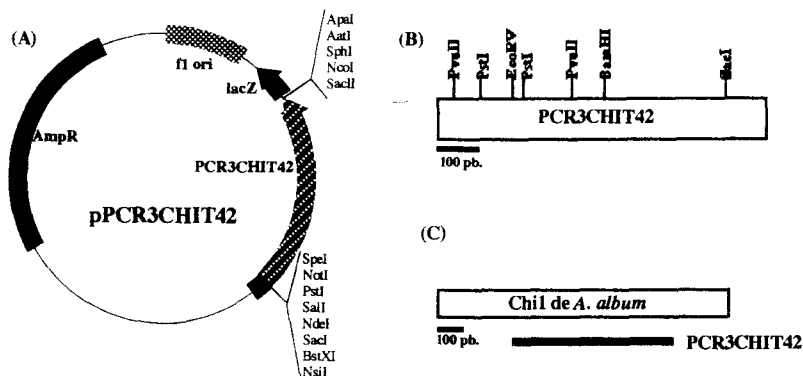
La banda específica, cuyo tamaño de migración (equivalente a 800 pb) correspondía al supuesto a partir del alineamiento de los oligonucleótidos con el gen de la quitinasa de *A. album*, fue aislada del gel y ligada al vector pGEM-T. Tras transformar *E. coli* NM522, se aislaron 18 transformantes, 12 de los cuales portaban el inserto de 800 pb. Dos de ellos, el 3 y el 13, fueron secuenciados, comprobándose que ambos contenían las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR. Además, los aminoácidos deducidos de la secuencia contigua al oligonucleótido antisentido coincidían con los obtenidos de la secuenciación de la proteína, como se muestra a continuación:

Oligonucleótido sentido: **NDVGTNAYGCVKQLFKVKK**  
 Quitinasa de *A. album*: NDVGTNAYGCVKQLYLLKK

Oligonucleótido antisentido: **YLKSLGLGGSMEWEASAD**  
 Quitinasa de *A. album*: WLKGGKGLGGSMEWEASAD

Las secuencias en **negrita** corresponden a las deducidas de los oligonucleótidos; las subrayadas, a las obtenidas a partir de la microsecuenciación de la proteína. El resto de aminoácidos se deduce de la secuencia de los transformantes 3 y 13, y, como se observa, presenta alto grado de similitud con la quitinasa de *A. album*. Todos estos datos sugerían fuertemente que el fragmento clonado correspondía a una secuencia interna del gen *chit42*.

La construcción utilizada para posteriores experimentos fue la que portaba el transformante n°3, PCR3CHIT42. Se realizó un mapa de restricción de dicha construcción, que se muestra en la figura 9, así como la localización del clon en la secuencia homóloga de *A. album*.



**Fig. 9. Clon PCR3CHIT42.** (A). Mapa del plásmido pPCR3CHIT42. (B). Mapa de restricción del inserto. (C). Localización de la secuencia en *A. album*.

### 1.1.3. Aislamiento de clones de cDNA de CHIT42.

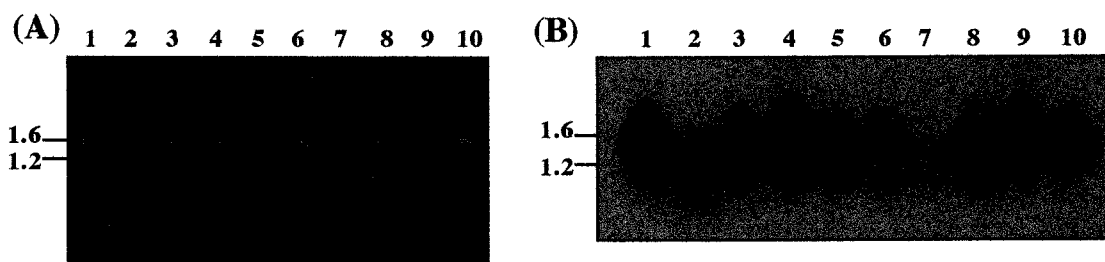
Una vez obtenido un fragmento que contenía parte de la secuencia del gen *chit42*, se procedió a aislar el correspondiente clon de cDNA. Para ello, se realizó el escrutinio de una genoteca de cDNA previamente construida en nuestro laboratorio a partir de RNA poliA<sup>+</sup> de micelio cultivado durante 33 h en medio mínimo CZ con quitina al 1.5% como

única fuente de carbono (Lora *et al.*, 1993). En estas condiciones, la actividad quitinasa era muy elevada (De la Cruz *et al.*, 1992).

Se sembraron unos 25000 fagos de la genoteca en 5 cajas de Petri de 120 mm de diámetro. Los fagos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa, e hibridados con el inserto que resultaba de la digestión con ApaI+Sall de PCR3CHIT42 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ . Una vez hibridados y lavados, los filtros se expusieron y se revelaron a los 4 días de exposición.

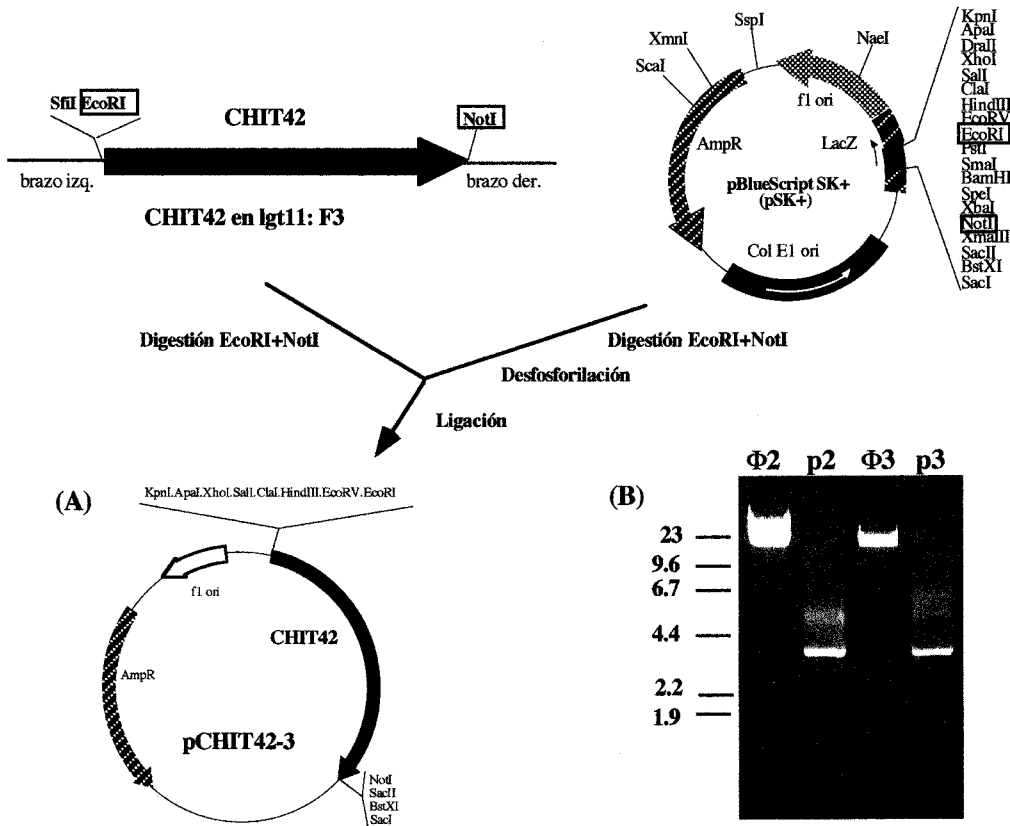
De los 75-80 fagos que hibridaban con la sonda, se eligieron 10 para obtener calvas puras, como se describe en el apartado 11 de *Materiales y Métodos*, hasta que, tras dos rondas de hibridación, todas las calvas de cada caja hibridaban con la sonda PCR3CHIT42.

El tamaño de los insertos que portaban los fagos se determinó mediante su amplificación por PCR, con el objetivo de elegir para posteriores manipulaciones aquellos que contuvieran el cDNA completo. Para albergar secuencias codificantes de 42 KDa, los insertos debían medir, al menos, 1.4 Kb. La reacción de PCR reveló que 7 de los 10 fagos portaban un único inserto de aproximadamente 1.6 Kb; otro, un inserto de 1.2 Kb, y otro, dos insertos de 1.6 y 0.9 Kb. No se amplificó ningún inserto en uno de los fagos, que no estaba purificado completamente. El DNA amplificado se transfirió a un filtro de nylon, y se hibridó con la sonda PCR3CHIT42, para comprobar los insertos. El resultado indicó que las bandas de 1.6 y 1.2 Kb correspondían a los cDNA supuestamente completo e incompleto, respectivamente, de CHIT42 (figura 10)



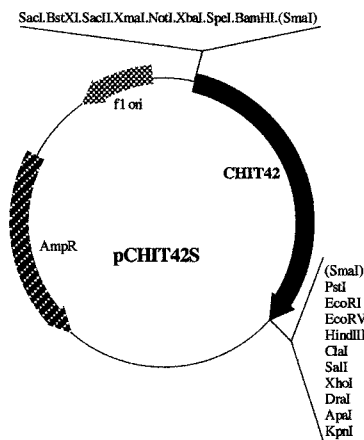
**Figura 10.** (A). PCR de los fagos. (B). Hibridación con la sonda PCR3CHIT42.

Se aisló DNA de los fagos 2 (clon supuestamente incompleto) y 3 (probablemente completo). El DNA obtenido se clonó en cada caso en sendos plásmidos pSK, como se indica en la figura 11-A. Para comprobar la identidad de los insertos en pSK, se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico y digestión con EcoRI y NotI (figura 11-B).



**Figura 11: Clonación de los fagos en pSK. (A).** Esquema de la clonación en pSK. **(B).** Digestiones EcoRI y NotI de los fagos (F 2 y 3) y de los plásmidos que contienen los mismos insertos (p 2 y 3).

Para facilitar posteriores manipulaciones, el inserto del plásmido pCHIT42-3 se liberó con las enzimas EcoRI y NotI, se trató con polimerasa Klenow y se clonó en el vector pSK cortado con SmaI. El plásmido resultante, esquematizado en la figura 12, se denominó pCHIT42S.

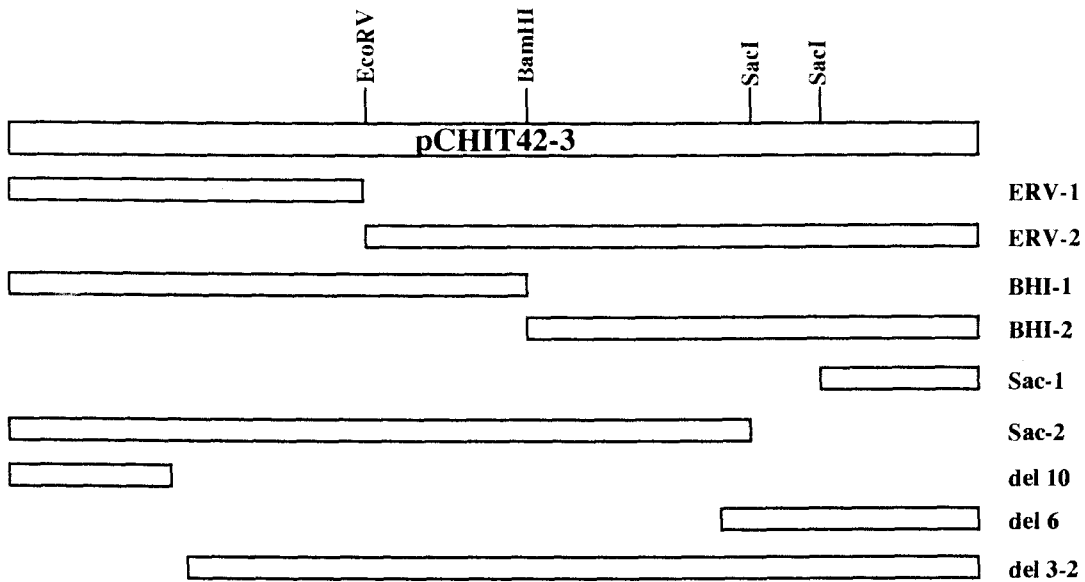


**Figura 12: Mapa de pCHIT42S**

## 1.2. SECUENCIA DEL cDNA CHIT42.

Para facilitar el trabajo de secuenciación del cDNA CHIT42, se siguieron dos estrategias complementarias. Por una parte, y aprovechando las dianas de restricción internas que presentaba el clon (ver figura ##), se subclonaron los fragmentos EcoRI-EcoRV, EcoRV-NotI, BamHI-BamHI, BamHI-EcoRI, EcoRI-SacI y SacI-EcoRI de pCHIT42-3 (los dos primeros) y pCHIT42S (el resto) (figura 13).

Por otra parte, se efectuaron deleciones del inserto original, que también se muestran en la figura \*. De este modo, se secuenciaron las dos cadenas del plásmido pCHIT42-3, y el extremo 5' del plásmido pCHIT42-2, que correspondía al fago más pequeño, y que, como se esperaba, correspondía a un cDNA incompleto del mismo gen. Se encontraron todas las secuencias parciales de aminoácidos previamente determinadas, lo que indicaba que el gen correspondía, efectivamente, a la proteína CHIT42. La secuencia de nucleótidos, así como la de aminoácidos deducida se presenta en la figura 14.



**Figura 13: Construcciones realizadas para la secuenciación del cDNA CHIT42.** En la parte superior se presenta el mapa de restricción del inserto CHIT42, y en la parte inferior, las subclonaciones y deleciones que se utilizaron para la secuenciación del clon completo.

CGTTGCTGTCGAGCTTGAACAATCTACCAACATCACAGAATTCACCATGTTGAGCTTCTCGGAAATCCGTAGCCTTG 81  
M L S F L G K S V A L

CTGGCTGCGCTGCAGGCTACTCTCAGCTCTCCGAAGCCTGGCCACAGAAGAGCGTCTGTTGAGAAGAGGCCAACGGATAC 162  
L A A L Q A T L S S P K P G H R R A S V E K R A N G Y

GCAAATCCGTCTATTTACCAACTGGGGCATCTACGACCGCAACTTCCAGCCTGCCGATTGGTGGCATCAGATGTCACT 243  
A N S V Y F T N W G I Y D R N F Q P A D L V A S D V T

CATGTCATCTACTCCTTCATGAACCTCCAGGCAGACGGCACAGTTATCTCTGGCGATACCTACCTGATTACGAGAAGCAC 324  
H V I Y S P M N L Q A D G T V I S G D T Y A D Y E K H

TATGCCGATGATTCTTGAATGATGTCGGCACCAATGCCTACGGCTGTGTCAAGCAGCTGTTCAAGGTCAGAAGGCCAAC 405  
Y A D D S W N D V G T N A Y G C V K Q L F K V K K A N

CGAGGCCTCAAGTTCTGCTCTCCATCGGTGGCTGGACTTGGTCCACCAACTTCCCTTCTGCAGCAAGCACGGATGCCAAC 486  
R G L K V L L S I G G W T W S T N F P S A A S T D A N

CGAAAGAAGTTTTCGAAAAGTCCATTACCTTTATGAAGGATTGGGGTTTCGATGGTATTGATATCGACTGGGAGTACCCT 567  
R K N F A K T A I T F M K D W G F D G I D I D W E Y P

GCAGACGCCACCCAGGCTCCAACATGATTCTTCTGCTGAAGGAAGTCCGATCTCAGCGTGATGCTTATGCTGCCAGTAT 648  
A D A T Q A S N M I L L L K E V R S Q R D A Y A A Q Y

GCCCCTGGCTACCACTTCTCCTCACCATTGCCGCCAGCTGGCAAGGACAAGTACTCCAAGCTGCCCTGGCTGATCTT 729  
A P G Y H F L L T I A A P A G K D N Y S K L R L A D L

GGCCAAGTCTCGACTACATCAACCTCATGGCCTACGACTACGCCGATCCTTCAGCCCCCTCACCGTCCAGACGCCAAC 810  
G Q V L D Y I N L M A Y D Y A G S P S P L T G H D A N

CTGTTTAAACAACCCGTCACCCCAATGCCACCCCTTCAACACCGATTCCGCTGTCAAGGATTATATCAATGGAGGTGTT 891  
L F N N P S N P N A T P F N T D S A V K D Y I N G G V

CCCGCCAACAAGATTGTTCTCGGCATGCCATCTACGGAAGATCATCCAGAACACCGCTGGTATTGGCCAGACTTACAAT 972  
P A N K I V L G M P I Y C R S F Q N T A G I G Q T Y N

GGTGTGGAAGTGAAGCTGGGAGGCCGGTATCTGGGATTACAAGGCTTCCCAAGGCTGGGCCACCGTCCAGTACGAT 1053  
G V G S G S W E A G I W D Y K A L P R A G A T V Q Y D

TCTGTCGCAAAGGGCTACTACAGCTACAACCTCCGCCACCAAGGAGCTCATCTCTTCGATACCCCCGACATGATCAACACC 1134  
S V A K G Y Y S Y N S A T K E L I S F D T P D M I N T

AAGTTGCCTATCTCAAGTCTCTCGGCCTGGGAGGTAGCATGTTCTGGGAGGCCCTCAGCCGACAAGAAGGGAGCTGACTCT 1215  
K V A Y L K S L G L G G S M F W E A S A D K K G A D S

GTGATTGGAACAAGCCACAGAGCTCTTGGAGGCCTGGACACAACCTCAAAACCTGCTGAGCTACCCCAACTCCAAGTATGAT 1296  
V I G T S H R A L G G L D T T Q N L L S Y P N S K Y D

AACATCAAGAATGGTCTGAAGTCTGCTGCTTTTGGAGCGCCTTATGGACATTGAAGTCGTCGCGGGGAAATCGTCTTG 1377  
N I K N G L N Z

GAGGAGCAGGGTCATGAAGTAAATATTTGTTTAAATACCTGTACATAGCCACATTAGCATATAGATGCATGAATAGTATCT 1458  
GAGTTTATTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1497

**Figura 14: Secuencia de nucleótidos del cDNA CHIT42 y secuencia de aminoácidos deducida.** Los aminoácidos presentados en color morado corresponden al péptido señal, y los azules, al posible péptido de activación. La única secuencia aminoacídica correspondiente a un sitio de glicosilación se presenta de color rojo, y las correspondientes a sitios de fosforilación, subrayadas. Las secuencias de aminoácidos obtenidas por microsecuenciación de la proteína están encuadradas.

### 1.2.1. Análisis de la secuencia.

El cDNA CHIT42 consta de 1497 pb, y contiene una fase abierta de lectura que codifica una proteína de 423 aminoácidos. La parte amino-terminal de la proteína madura, deducida a partir de los datos de secuenciación de la proteína purificada (ver tabla %), se encuentra a partir del aminoácido 35 de la proteína deducida. Los 34 aa precedentes se encuentran organizados en dos módulos que difieren en perfil de hidrofobicidad y en la estructura (figura 15). Los aa 1 a 22 conforman una secuencia muy hidrofóbica, probablemente correspondiente al péptido señal (von Heijne, 1983). A continuación, los aminoácidos 23 a 34, hidrofílicos, acaban en la secuencia VEKR, siendo estos dos últimos aminoácidos la secuencia consenso de reconocimiento y proteólisis por parte de la endoproteasa Kex2, descrita en numerosos organismos (Park *et al.*, 1994; Vázquez de Aldana *et al.*, 1991; Blaiseau y Lafay, 1992; Geremía *et al.*, 1993; Kinai *et al.*, 1995), e involucrada en el procesamiento de proteínas secretadas (Julius *et al.*, 1984; Fuller *et al.*, 1989; Tao *et al.*, 1990; Stark y Boyd, 1986).

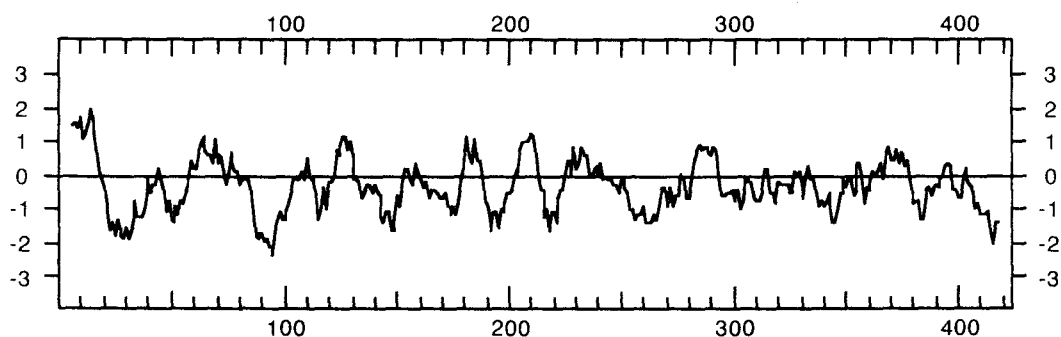


Figura 15: Perfil de hidrofobicidad de la secuencia de aa deducida de CHIT42.

La proteína madura, por lo tanto, comienza en el aminoácido nº 35. Los parámetros bioquímicos estimados para la secuencia de aminoácidos deducida son muy similares a los que se obtienen experimentalmente para la proteína purificada: el peso molecular estimado es de 40 kDa, y el medido, 42, y el punto isoeléctrico estimado es de 5.7, y el medido, de 6.2 (De la Cruz *et al.*, 1992).

### 1.2.2. Homología de CHIT42 con otras proteínas.

La secuencia de aminoácidos deducida del cDNA CHIT42 fue comparada con las de la base de datos SwissProt. Se encontraron homología significativas con una serie de quitinasas y con la subunidad a de la toxina killer de *Kluyveromyces lactis*. La quitinasa Chi1 de *A. album* presentaba la homología más elevada, de un 75% de identidad y un 85% de similaridad. Las quitinasas de las bacterias *Bacillus circulans* y *Serratia marcescens* eran también similares a CHIT42 (tabla 14). Posteriormente, se han incluido en las bases de datos otras quitinasas, como la de *Trichoderma hamatum*, *Alteromonas* sp., *Streptomyces lividans* y *Streptomyces plicatus*, que también presentan homología significativa con CHIT42.

Organismo	Proteína	% identidad	Tamaño del alineamiento (aa)
<i>T. hamatum</i>	Endoquitinasa	86	428
<i>A. album</i>	Quitinasa Chi1	75	423
<i>B. circulans</i>	Quitinasa Chi1	32.8	290
<i>S. marcescens</i>	Quitinasa ChiA	31.1	341
<i>Alteromonas sp.</i>	Precursor de la quitinasa ChiA	32.9	161
<i>S. lividans</i>	Precursor de la quitinasa C	34.7	366
<i>S. plicatus</i>	Precursor de la quitinasa 63	33	376
<i>S. marcescens</i>	Precursor de la quitinasa ChiB	36.5	178
<i>K. lactis</i>	Precursor de las subunidades a y b de la toxina killer	23.2	328

**Tabla 14. Identidad (%) de CHIT42 con otras quitinasas y con la subunidad a de la toxina killer de *K. lactis*.**

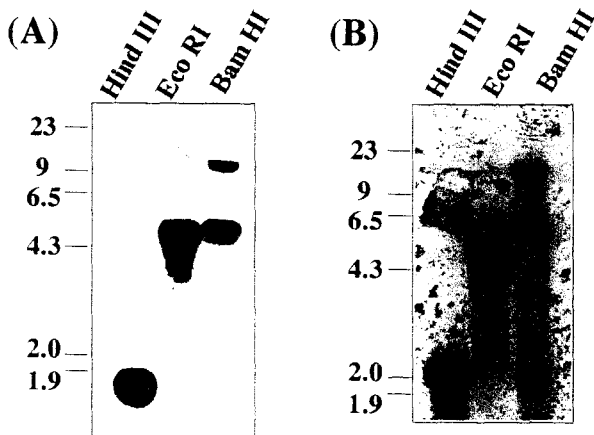
Hay una región especialmente conservada entre esas proteínas, y presente también en otras quitinasas de plantas cuya homología global con CHIT42 es muy baja. Esta región contiene el posible sitio activo de CHIT42 (figura 16). Los aminoácidos involucrados en la acción catalítica de la quitinasa A1 de *B. circulans*, un Asp y un Glu (Watanabe *et al.*, 1993), se encuentran en CHIT42 en las posiciones 167 y 171, y se señalan en la figura 16 con un asterisco.

CHIT42	RGLK <b>VLLSIG</b>	GWTWST....	...NFPSAAS	TDANRKNFAK	TAITFMKDWG	...FDG <b>IDID</b>	<b>WE</b> YPADAT..
<i>A. album</i>	RNMK <b>VMLSIG</b>	GWTWST....	...NFPAAS	SAATRKTFAQ	SAVGFMKDWG	...FDG <b>IDID</b>	<b>WE</b> YPADAT..
<i>Bac</i>	PNLK <b>TIISVG</b>	GWTWSN....	...RFSDVAA	TAATREVFAN	SAVDFLRKYN	...FDG <b>VLDL</b>	<b>WE</b> YPVSGGLD
<i>Serr B</i>	PSLR <b>IMFSIG</b>	GWYYSNDLGV	SHANYVNAVK	TPAARTKFAQ	SCVRIMKDYG	...FDG <b>VDD</b>	<b>WE</b> YPQAAEVD
<i>Serr A</i>	PDL <b>KILPSIG</b>	GWTLSDPFFF	.....MG	DKVKRDRFVG	SVKEFLQTK	..F <b>FDGVDID</b>	<b>WE</b> FPGGKGAN
<i>Cucum</i>	QNVK <b>VLLSIG</b>	G...GAGSYS	LSSADDAKQV	ANFIWNSYLG	GQSDS.RPLG	AAV <b>LDGVDFD</b>	<b>IE</b> SGSQFWD
<i>Arab</i>	RGIK <b>VMLSLG</b>	G...GIGNYS	IGSREDAKVI	ADYLWNNFLG	GKSSS.RPLG	DAV <b>LDGIDFN</b>	<b>IE</b> LGSFQHW
<i>Rhiz</i>	KGVK <b>VILSLG</b>	G...AAGVYG	FTSDAQGQF	AQTIWNLFGG	GSSDT.RPFG	DAV <b>IDGVLDL</b>	<b>IE</b> GGASTG..
<i>Sacch</i>	LGKK <b>VLLSLG</b>	G...ASGSYL	ESDDSQAETF	AQTLWDTFGE	GTGASERPF	SAV <b>VDFDFD</b>	<b>IE</b> NNNEV...
Killer	.....	.....	.....AKQV	ANFIWNSYLG	GQSDS.RPLG	AAV <b>LDGVDFD</b>	<b>IE</b> SGSQFWD

**Figura 16. Comparación de CHIT42 con otras quitinasas.** Las regiones en rojo se encuentran especialmente conservadas entre estas proteínas; los aminoácidos posiblemente implicados en la acción catalítica (comprobado en el caso de A1 de *B. circulans*) se señalan con un asterisco.

### 1.2.3. Organización genómica del gen *chit42*.

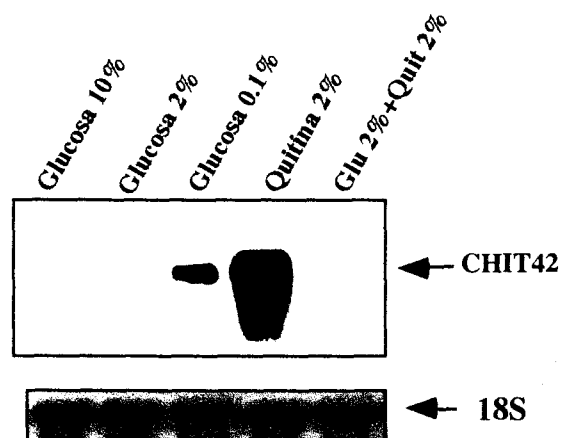
En la figura 17 se muestra un análisis Southern realizado con DNA genómico de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 digerido con diversas enzimas de restricción, y utilizando como sonda el cDNA CHIT42 completo. La autorradiografía reveló una única banda en la digestión con *HindIII* y con *EcoRI* (que carecen de sitios de restricción en el cDNA), y de dos bandas en el carril de la digestión con la enzima *BamHI* (para la cual existe un sitio de restricción en el cDNA). Esto demuestra que *T. harzianum* tiene una sola copia del gen *chit42* en su genoma. En la hibridación a más baja temperatura, en condiciones poco restrictivas, no se observaron bandas adicionales, lo cual indica que no existen genes homólogos a *chit42* en el genoma de *Trichoderma*.



**Figura 17: Southern-blot de *chit42*.** (A). Condiciones muy restrictivas. (B). Condiciones poco restrictivas.

### 1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *chit42* EN *Trichoderma harzianum*.

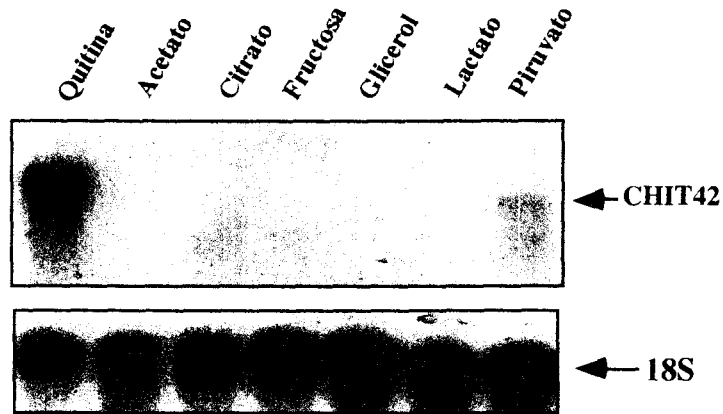
Un primer paso en la caracterización del papel de la quitinasa CHIT42 en el micoparasitismo consistió en el estudio de la acumulación del RNA mensajero correspondiente en diferentes condiciones. Se llevaron a cabo varios ensayos tipo northern, con RNA extraído de micelio de *Trichoderma* cultivado en medio mínimo CZ con diferentes fuentes de carbono. La figura 18 muestra que el mRNA CHIT42 es específicamente inducido por quitina, mientras que la glucosa actúa como un fuerte represor de la transcripción del gen, aun cuando en el medio de cultivo haya quitina en concentraciones inductoras. El hecho de que en condiciones de hambre de carbono (glucosa al 0.1% como única fuente de carbono) la acumulación de mensajero sea menor que en quitina indica que existe una inducción específica del gen por este polímero, y no sólo una desrepresión por ausencia de glucosa.



**Figura 18: Represión catabólica de la transcripción de *chit42*.**

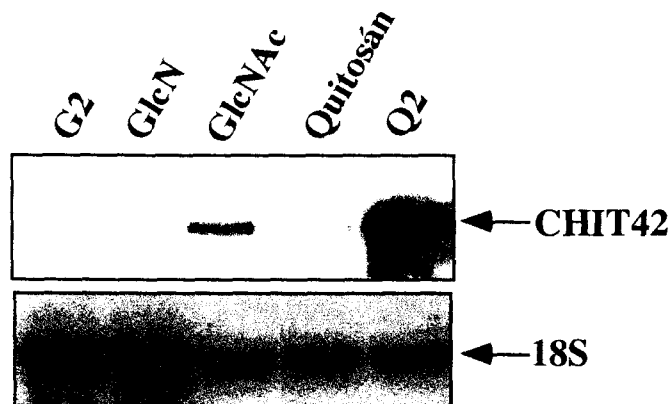
La figura 19 muestra la acumulación del mensajero CHIT42 cuando se cultiva el hongo en medio mínimo con diferentes metabolitos intermediarios como única fuente de carbono. El mRNA tan sólo se detectó, y en muy baja cantidad, en presencia de piruvato.





**Figura 19:** Expresión de *chit42* en cultivos de *T. harzianum* que contienen diversos metabolitos intermediarios como única fuente de carbono.

La figura 20 muestra el patrón de acumulación del mRNA CHIT42 en cultivos de *T. harzianum* que contienen diversos intermediarios del metabolismo de la quitina (GlcN y GlcNAc) y su derivado parcialmente desacetilado (quitosán) como única fuente de carbono. El gen *chit42* se expresa solamente en cultivos con GlcNAc, el monómero de la quitina, y su mRNA está ausente en las otras condiciones señaladas.



**Figura 20.** Acumulación del mensajero CHIT42 en presencia de productos relacionados con la quitina.

Por último, en la figura 21 se muestra la acumulación del mensajero CHIT42 en micelio de *Trichoderma* cultivado en medio mínimo con diferentes micelios autoclavados de hongos como única fuente de carbono. El análisis northern indica que los micelios de dichos hongos (*Botrytis cinerea*, *Gibberella fujikuroi*, *Rhizoctonia solani* y el propio *T. harzianum*) son capaces de inducir fuertemente la expresión del gen *chit42* en *T. harzianum*, alcanzando niveles superiores a los obtenidos en quitina. Al cultivar el hongo en presencia de micelios autoclavados de *Phytophthora*, que carece de quitina en su pared celular, se detecta una acumulación de mensajero algo menor que la observada en quitina y, por lo tanto, mucho menor que la obtenida en cultivos en presencia de micelios de otros hongos que contienen quitina en su pared.

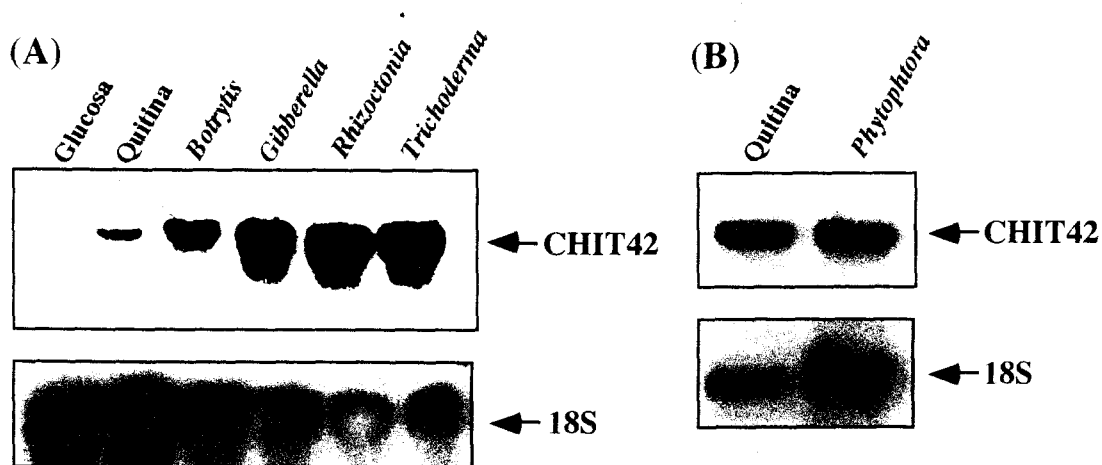


Figura 21: Acumulación del mensajero CHIT42 cuando se cultiva *T. harzianum* en presencia de micelios autoclavados de hongos que contienen (Panel A: *Botrytis*, *Gibberella*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*) o no (Panel B: *Phytophthora*) quitina en su pared.

En resumen, el gen *chit42* de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 está sometido a una estricta y compleja regulación transcripcional.

#### 1.4. PRESENCIA DEL GEN *chit42* EN OTRAS ESPECIES DE *Trichoderma* Y EN LA ESPECIE AFÍN *Gliocladium virens*.

Otra aproximación que se siguió en este trabajo consistió en investigar la presencia del gen *chit42* en varias especies de *Trichoderma* y en la especie estrechamente relacionada *G. virens* (recientemente clasificada como *Trichoderma virens*). Entre estas especies, algunas han sido descritas como micoparásitas (*T. harzianum*, *T. viride* y *G. virens*), mientras que no se ha encontrado actividad micoparasitaria en otras (*T. koningii*, *T. longibrachiatum* y *T. reesei*). El análisis Southern, en el que se utilizó la sonda CHIT42 marcada radiactivamente (figura 22), muestra claramente la existencia de bandas en todos los carriles, lo cual indica que el gen está presente en cada uno de los genomas.

A pesar de la presencia del gen *chit42* en los genomas de especies micoparásitas y no micoparásitas de hongos relacionados, los datos de northern que se presentan en la figura 23 muestran que los niveles de inducción del gen en cultivos de los hongos en quitina al 2% como única fuente de carbono son variados, según se trate de cepas descritas como micoparásitas o como no micoparásitas. Incluso entre las micoparásitas existe una clara diferencia entre las especies *T. harzianum* y *viride*, que presentan grandes cantidades de mensajero, y la especie *G. virens*, cuyos niveles de expresión de *chit42* son mucho más bajos. No se detectó acumulación del mensajero en los carriles correspondientes a los hongos no micoparásitos.

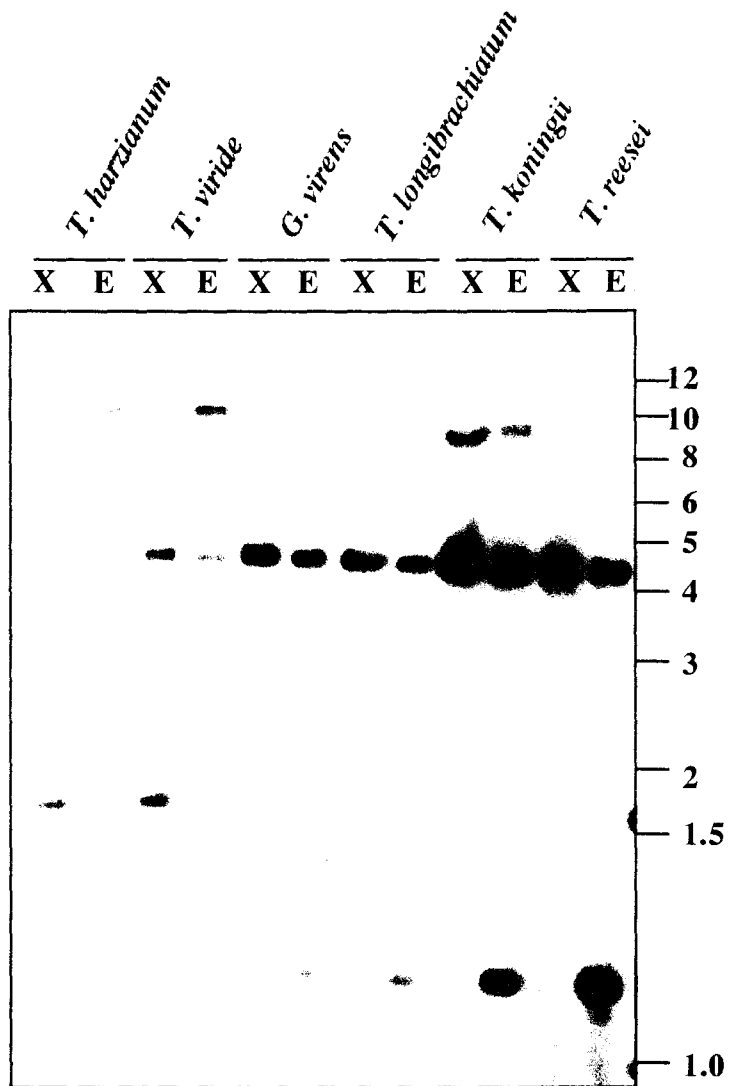


Figura 22. Presencia del gen *chit42* en otras especies de *Trichoderma* y en *G. virens*. X: *Xba*I, E: *Eco*RI.

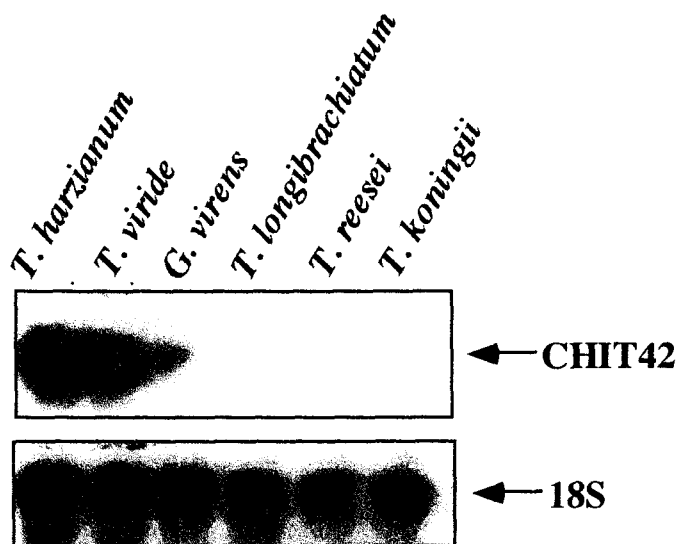


Figura 23. Acumulación del mRNA CHIT42 en otras especies de *Trichoderma* y en *G. virens* cuando se cultivan en presencia de quitina.

## 2. EXPRESIÓN DE LA QUITINASA CHIT42 EN PLANTAS DE TABACO.

### 2.1. PLANTAS CHIT42.

#### 2.1.1. Construcción CHIT42.

Para expresar la quitinasa CHIT42 en plantas de tabaco, se realizó una primera construcción con el cDNA completo bajo el control del promotor de la subunidad 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), de expresión constitutiva en plantas, y el terminador de la nopalina sintetasa (NOS) de *A. tumefaciens* (Taylor *et al.*, 1987). Ambos elementos se encuentran en el plásmido pBI221, de fácil manejo dado su pequeño peso molecular (unos 5.5 kDa), y que presenta alto número de copias en *E. coli*. En primer lugar se clonó el cDNA en pBI221 según la estrategia que se indica en la figura 23.

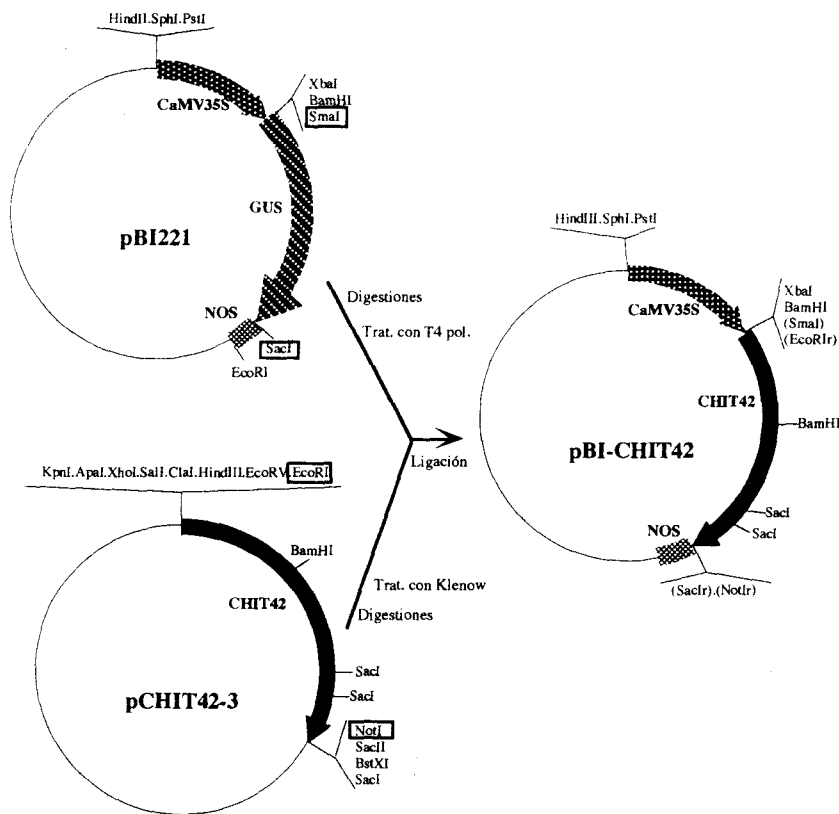
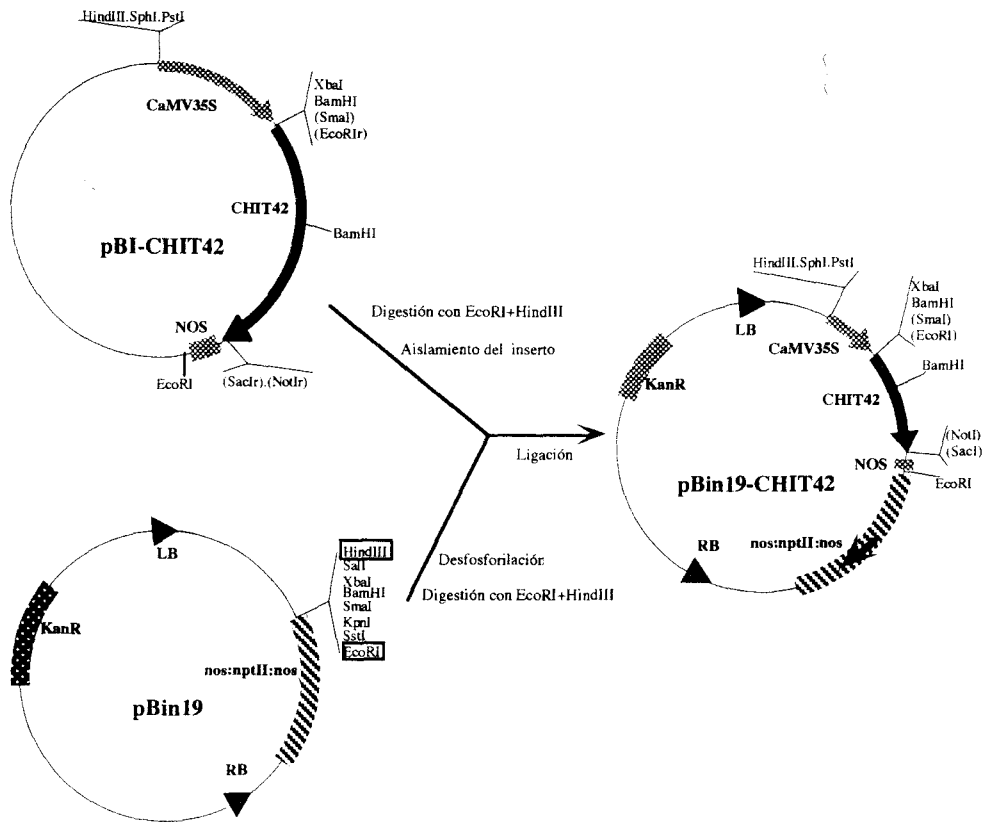


Figura 23. Realización de la construcción pBI221-CHIT42.

Los numerosos transformantes que se obtuvieron fueron analizados por digestión de los plásmidos que portaban con la diana interna *Bam*HI y con *Eco*RI+*Sac*I, para elegir aquellos que contenían el cDNA CHIT42 en la orientación adecuada.

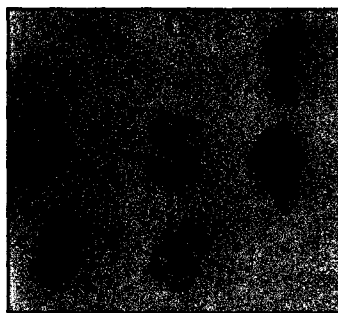
En un segundo paso, se aisló el cassette de la quitinasa con el promotor y el terminador digiriendo con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI, y se incluyó en el plásmido binario pBin19 digerido con las mismas enzimas y desfosforilado (figura 24).



**Figura 24. Realización de la construcción pBin19-CHIT42.**

La presencia del cDNA CHIT42 en el plásmido pBin19/CHIT42 se determinó por PCR, usando como cebadores los mismos oligonucleótidos utilizados para aislar el gen. Entre las colonias positivas, se eligieron 6 para un examen más detallado. La digestión con *EcoRI*+*HindIII* confirmó la presencia del cassette en 5 de ellos.

Uno de los plásmidos positivos se introdujo en *A. tumefaciens* mediante transformación. Los transformantes se seleccionaron en presencia de kanamicina y estreptomycin. La presencia del plásmido pBin19/CHIT42 se comprobó por minipreparaciones de DNA plasmídico de 6 de esos transformantes, y digestión con *EcoRI* y *HindIII*. Paralelamente, se realizó una hibridación de colonias de los transformantes, usando la sonda PCR3CHIT42. Todos los transformantes contenían el cDNA, como se aprecia en la figura 25.

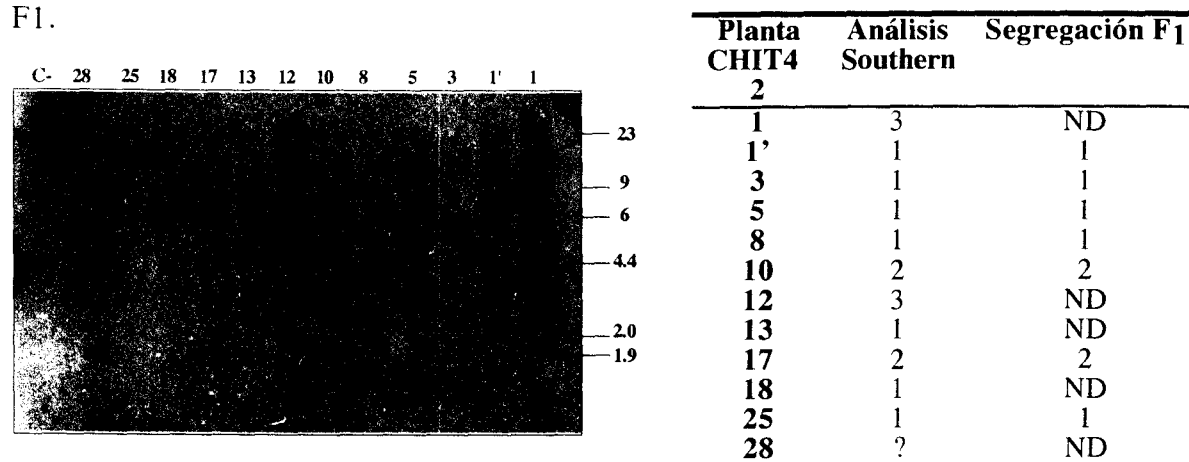


**Figura 25. Hibridación de colonias de *Agrobacterium* con CHIT42.**

## 2.1.2. Transformación de plantas con la construcción CHIT42.

Se eligió un transformante de *A. tumefaciens* para la transformación de discos de hoja de tabaco. La cocultivación con discos de hojas y la inducción de callos y brotes se realizó según se especifica en el apartado 13 de Materiales y Métodos, y se eligieron 40 tallos bien formados y verdes. De las plantas que enraizaron en medio selectivo (Kan100), 17 se pasaron a tierra y fueron mantenidas en una cámara de cultivo en las condiciones que se detallan en el apartado de *Materiales y Métodos*. Se conservó de cada planta una réplica en cultivo *in vitro*.

La presencia del cDNA CHIT42, y el número de copias que contenían las plantas transgénicas se analizó por Southern-blot, hibridando con la sonda PCR3CHIT42 el DNA total de las plantas digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. Puesto que la única diana *EcoRI* presente en la construcción introducida en las plantas se encuentra fuera del fragmento que contiene la fase abierta de lectura del cDNA CHIT42, el número de bandas obtenido en la hibridación corresponde al número de integraciones del gen en la planta. Los datos obtenidos fueron constatados posteriormente mediante análisis de segregación de las semillas en medio con kanamicina (MSKan300). La figura 26 muestra el Southern realizado con las plantas CHIT42, así como los resultados del test de segregación de la F1.

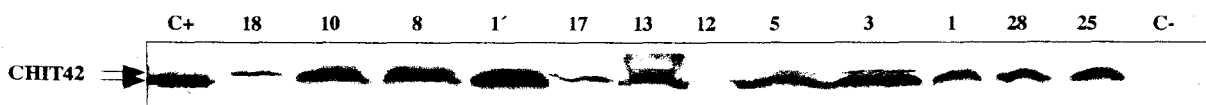


**Figura 26. Southern y test de segregación de las plantas CHIT42.** ND: no determinado.

En algunas ocasiones se ha encontrado que, tras la integración de un gen en el genoma de una planta, la proteína que codifica no se expresa. Este fenómeno puede tener varios motivos: inactivación génica por la existencia de secuencias homólogas en el genoma hospedador (revisado por Flavell, 1994), efecto de regiones adyacentes al sitio de inserción, reorganizaciones del T-DNA, grado de metilación del DNA, efectos epigenéticos en la generación parental, o el diferente estado fisiológico de los transformantes que puede conllevar diferencias en el patrón de expresión espacio-temporal (Jones *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1989). El análisis Southern previo puso de manifiesto la ausencia de regiones homólogas al cDNA CHIT42 en las plantas de tabaco, y por tanto, no cabía esperar fenómenos de supresión génica.

A continuación se realizó un análisis western de las plantas transgénicas. Para ello, se resolvieron extractos de proteína total de hojas de plantas control y transgénicas en

geles de acrilamida, que se transfirieron a filtros y se incubaron con el anticuerpo anti-CHIT42. Los resultados se muestran en la figura 27.

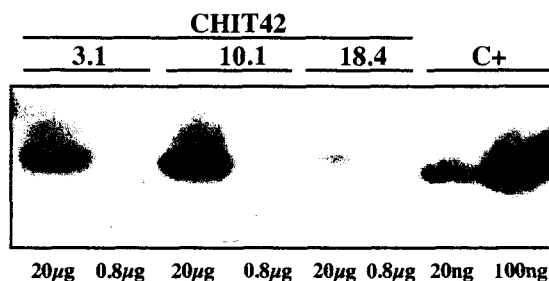


**Figura 27. Western de las plantas CHIT42.** C+ corresponde a 20ng de la quitinasa CHIT42 aislada de sobrenadantes de cultivos de *Trichoderma* que contenían quitina como única fuente de carbono.

Se observa claramente en los extractos de las plantas transgénicas la reacción específica del anticuerpo con una proteína de aproximadamente 43 kDa, unos 2kDa mayor que la proteína aislada de *Trichoderma*.

### 2.1.3. Cuantificación de la expresión de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas CHIT42.

Un estudio más detallado de los análisis western realizados con las plantas CHIT42 se presenta en la figura 28. En el mismo filtro, se analizan cantidades conocidas de la proteína CHIT42 purificada y diferentes diluciones de los extractos de proteínas totales de plantas. Con ayuda de un analizador de imágenes (programa NIH Image), se cuantificó la intensidad de las bandas que reaccionaban con el anticuerpo en cada caso, determinándose así el porcentaje de expresión de la quitinasa en las plantas transgénicas. Los datos obtenidos oscilaban entre un 0.01 y un 0.08% (proteína CHIT42/proteína total del extracto).



**Figura 28. Western de cuantificación.** C+ corresponde a la proteína CHIT42 purificada a partir de sobrenadantes de cultivos de *Trichoderma* inducidos por quitina. Debajo del filtro se señalan la cantidad de proteína CHIT42 purificada que se ha cargado en cada carril, así como las cantidades de proteína total de extractos proteicos de hojas de las plantas transgénicas que se ha utilizado en cada caso.

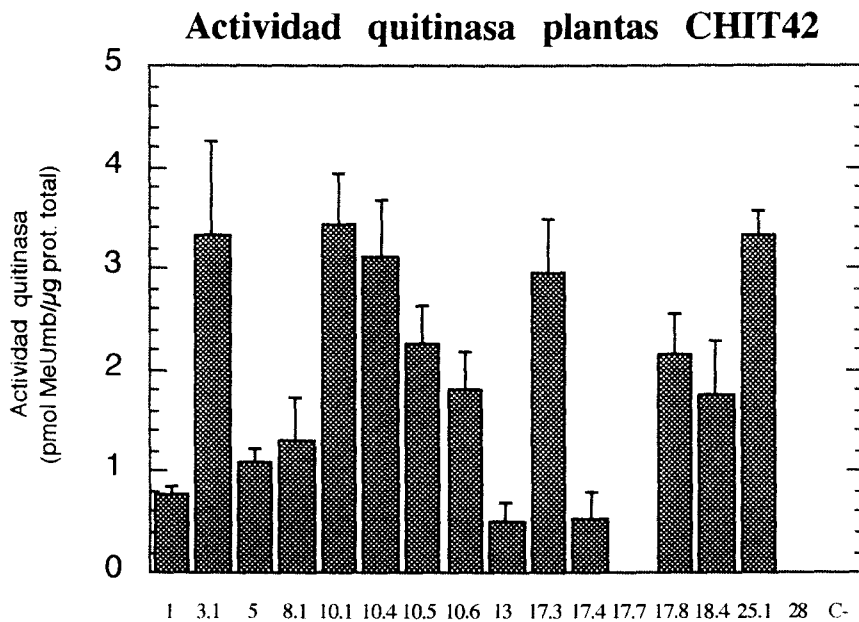
### 2.1.4. Determinación de la actividad quitinasa de las plantas CHIT42.

Para averiguar si la quitinasa que expresaban las plantas CHIT42 era funcional, se realizaron medidas de actividad quitinasa de extractos proteicos de hojas de plantas que habían crecido en condiciones control, es decir, no sometidas a ningún tipo de estrés.

En una primera aproximación, se utilizó el método de la quitina coloidal (ver apartado 19.1. de *Materiales y Métodos*). Los resultados obtenidos para las muestras de las plantas transgénicas no diferían significativamente de los obtenidos para los extractos

de las plantas control ni para el tampón fosfato solo. Estos datos sugerían que la quitinasa expresada en estas plantas no era activa.

Sin embargo, un método de medida de actividad quitinasa mucho más sensible, basado en la utilización del sustrato fluorescente 4-β-D-metilumbeliferil-N, N', N''-triacetil quitotriósido (MeUmbQ, ver apartado 19.2. de *Materiales y Métodos*), puso de manifiesto una mayor actividad quitinasa en los extractos de las plantas transgénicas que en los de las plantas control (figura 29).



**Figura 29. Actividades quitinasa de las plantas CHIT42.**

Si se compara la gráfica anterior con las figuras D y F, se puede observar que, en líneas generales, la actividad quitinasa es proporcional a la cantidad de proteína expresada. De hecho, los bajos niveles de expresión de la proteína CHIT42 en las plantas CHIT42 originan en estas plantas bajos niveles de actividad quitinasa, que en ningún caso superan las 5 unidades, y que incluso en ciertas plantas (17.7 y 28) es indetectable e indistinguible de la actividad que presentan las plantas control o el tampón fosfato solo.

Los bajos niveles de actividad quitinasa detectados en las plantas CHIT42, así como el aumento de movilidad electroforética que exhibía la proteína expresada en el sistema heterólogo, sugería que la quitinasa no estaba siendo procesada correctamente. Por lo tanto, se diseñó una nueva construcción en la que se sustituía el péptido señal y el posible péptido de activación por un péptido señal de plantas, para asegurar así la adecuada secreción y la correcta maduración de la proteína en las plantas de tabaco.



## 2.2. PLANTAS psCHIT42.

El objetivo de esta parte del trabajo era obtener plantas que expresaran grandes cantidades de la proteína CHIT42 de forma enzimáticamente activa. Para ello, se diseñó una estrategia que solventaba no sólo los problemas de excreción y maduración de la proteína, sino que también evitaba eventuales problemas de inestabilidad del mRNA heterólogo. Para ello, se sustituyó la zona 5' no codificante del cDNA fúngico por una de plantas (en este caso, de la proteína P1-p14 de tomate), y parte de la zona 3' no codificante por el terminador NOS del plásmido pBI221.

La construcción psCHIT42 se realizó en una serie de fases. En la figura 30 se esquematiza la construcción psCHIT42, y se compara a la que portan las plantas CHIT42.

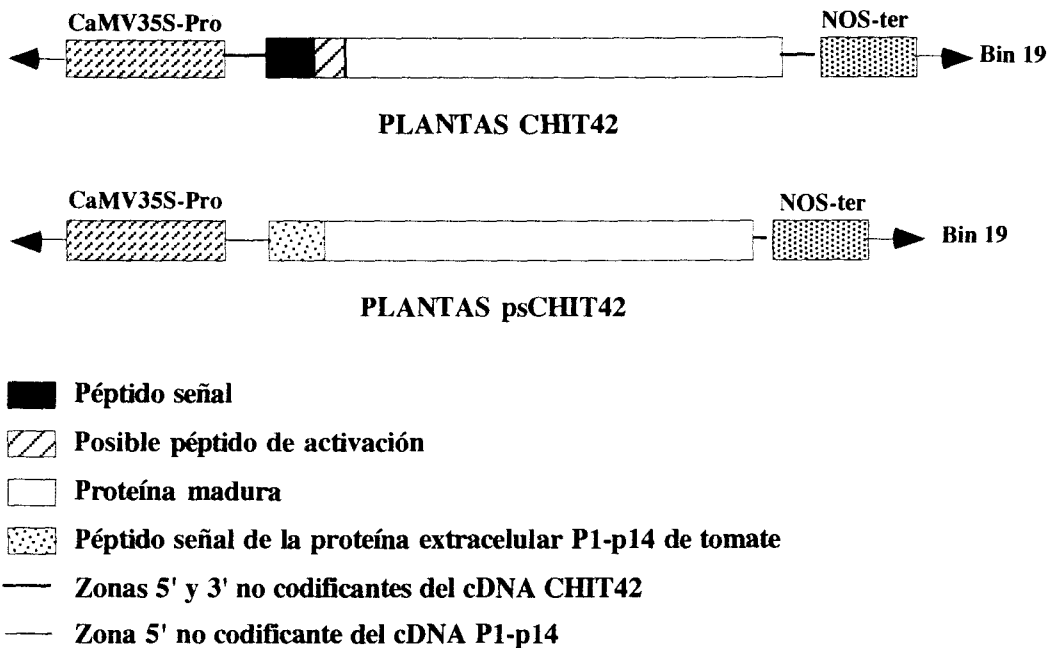
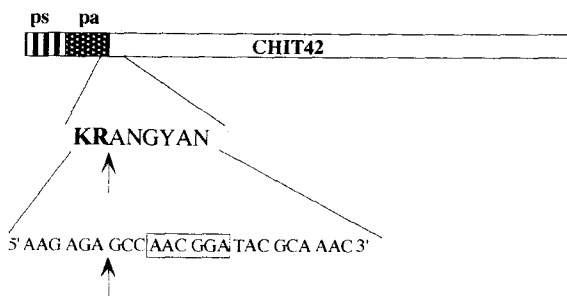


Figura 30. Esquema de las construcciones CHIT42 y psCHIT42.

### 2.2.1. Mutagénesis.

#### 2.2.1.1. Mutagénesis *in vitro*: cDNA CHIT42.

En primer lugar, se construyó una versión del cDNA CHIT42 que correspondía a la proteína madura. Para ello, era necesario eliminar el péptido señal fúngico y el posible péptido de activación, acabado en la secuencia Lys-Arg. En la figura 31 se esquematiza la secuencia elegida para la creación de una diana de restricción *Sma*I por mutagénesis *in vitro*.



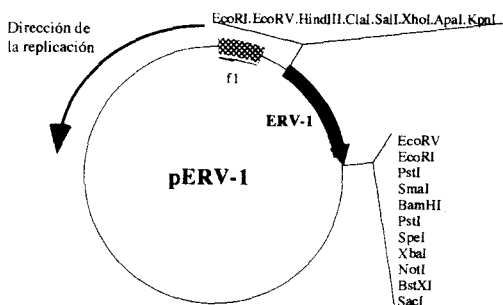
**Figura 31. Elección de la secuencia para la mutagénesis in vitro del cDNA CHIT42.** Se indican las secuencias aminoacídica y nucleotídica de la zona del final del péptido de activación y el comienzo de la proteína madura CHIT42. En negrita se señalan los aminoácidos que pertenecen al péptido señal. La flecha indica el sitio de corte de la endoproteasa Kex2. La alanina (A) adyacente a la secuencia KR constituye el primer aminoácido de la proteína madura. Los nucleótidos elegidos para crear una diana *SmaI* están encuadrados.

Las secuencias nucleotídicas encuadradas en la figura fueron elegidas para la creación de una secuencia diana de la enzima *SmaI*. De este modo, y teniendo en cuenta que la cadena molde que posteriormente se sintetizaría sería la antisentido (ver más adelante, figura 32), el oligonucleótido diseñado para la mutagénesis fue el siguiente:



La secuencia de nucleótidos señalada en negrita corresponde a la diana *SmaI* que se deseaba introducir en la secuencia de DNA. La glicina en negrita indica el primer aminoácido que se obtendría al cortar con *SmaI* el clon resultante de la mutagénesis dirigida. La proteína codificada por la secuencia mutada tras la digestión con *SmaI* carecería por lo tanto de los dos primeros aminoácidos presentes en la proteína madura nativa: esta estrategia parecía adecuada para nuestros propósitos.

Una vez diseñado el oligonucleótido, se obtuvo el DNA unicatenario molde para la reacción de mutagénesis *in vitro*. Para ello, y para evitar la acumulación de errores en la síntesis de la cadena mutada, se eligió la construcción pERV-1 (ver figura 13), que contenía aproximadamente las primeras 500 pb del cDNA CHIT42. De esta construcción se obtuvo DNA de la cadena antisentido por replicación a partir del origen de replicación fágico f1 (figura 32).

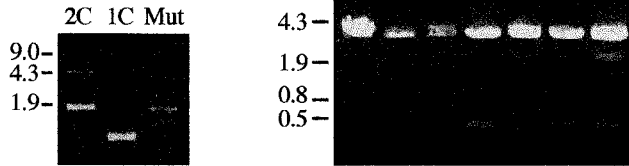


**Figura 32: Dirección de la replicación de la construcción pERV-1.** El fago M13K07 origina a partir del origen de replicación de f1 la cadena antisentido del inserto, que se utilizará como DNA molde para la mutagénesis

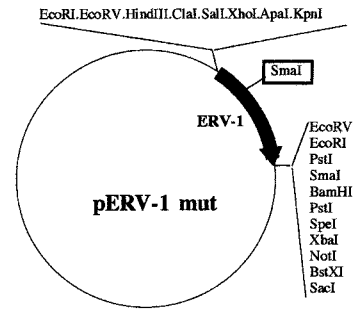
A continuación, se llevaron a cabo las reacciones de apareamiento con el oligonucleótido, y de síntesis de la segunda cadena. Con el DNA bicatenario obtenido se

transformaron células de *E. coli* DH5a, y las colonias transformantes se analizaron por digestión de su DNA plasmídico con la enzima *SmaI*. Las 7 colonias analizadas presentaban una diana *SmaI* adicional (la construcción original ya contenía una), lo cual indicaba que la mutación se había introducido (Figura 33).

(A)



(B)



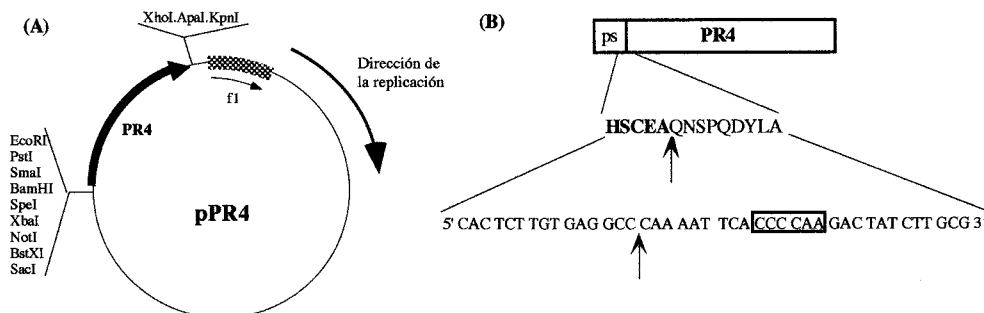
**Figura 33: Mutagénesis de CHIT42.** (A) DNA original (2C), uncatenario (1C) y obtenido tras el proceso de mutagénesis (Mut). Digestiones *SmaI* de los transformantes obtenidos. (B). Esquema de la diana introducida (pERVmut).

Uno de los transformantes se secuenció para comprobar la ausencia de mutaciones adicionales a las deseadas. La secuencia obtenida presentaba únicamente los cambios inicialmente diseñados, introducidos a propósito con el oligonucleótido.

### 2.2.1.2. Mutagénesis por PCR: cDNA pTE 28.1.

El cDNA pTE 28.1 corresponde a la proteína PR P1-p14 de tomate cuya expresión se induce en platas infectadas con viroides (Tornero *et al.*, 1993). La presencia de un péptido señal permite la excreción de la proteína P1-p14 al espacio apoplástico (Vera *et al.*, 1989). Puesto que disponíamos de este clon de cDNA, se utilizó su péptido señal como péptido de excreción de la proteína CHIT42 madura.

De este modo, y siguiendo la estrategia descrita previamente, se diseñó el oligonucleótido pTE (figura 34), que incorpora una diana *SmaI* al final de la secuencia correspondiente al péptido señal de la proteína P1-p14.



**Figura 34: Clon pTE28.1.** (A). Mapa del plásmido pTE28.1. Se señala la dirección de la replicación a partir del origen f1. (B). Secuencias aminoacídica y nucleotídica de la zona del final del péptido señal y el comienzo de la proteína madura. En negrita se señalan los aminoácidos que pertenecen al péptido señal. La flecha señala el sitio de procesamiento del péptido señal. Los nucleótidos elegidos para crear una diana *SmaI* están encuadrados.

Los oligonucleótidos que se podían diseñar para la mutagénesis eran los siguientes, uno en la dirección de la transcripción, y otro en la dirección contraria:

Sentido: 5' CAA AAT TCA **CCC GGG** GAC TAT CTT GCG 3'

Aas. Gln Asn Ser Pro Gly Asp

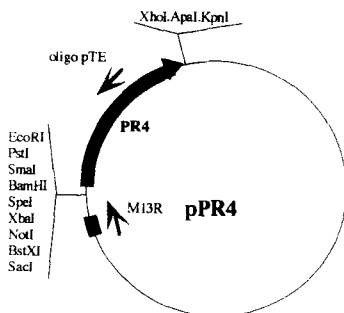
Antisentido: 5' CGC AAG ATA GTC **CCC GGG** TGA ATT TTG 3'

En negrita se señala la diana *SmaI* originada. Dado que en este caso, la cadena de DNA molde que se sintetiza a partir del f1 es la cadena sentido (ver figura K), el oligonucleótido que se eligió para la mutagénesis es el antisentido, que presenta tres cambios con respecto a la secuencia original en una longitud de 27 nucleótidos.

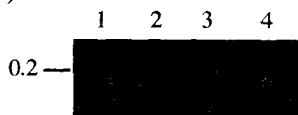
Una vez diseñado el oligonucleótido, se realizó la mutagénesis *in vitro* sobre el clon completo pTE 28.1, sin obtenerse ningún resultado positivo. Por tanto, y teniendo en cuenta el pequeño tamaño del fragmento que se deseaba utilizar para las construcciones posteriores (unas 200 pares de bases), se decidió realizar la mutagénesis mediante PCR, y secuenciar los fragmentos que se obtuvieran. Se esperaba que, entre ellos, alguno portara la mutación deseada y no presentara otras adicionales.

De este modo, y utilizando también el oligonucleótido M13 Reverso (ver figura 34), se realizó la reacción de PCR, cuyo resultado se muestra en la figura L, y que coincidía perfectamente con el esperado: una sola banda de aproximadamente 200 pb.

(A)



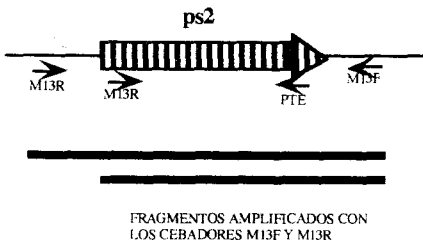
(B)



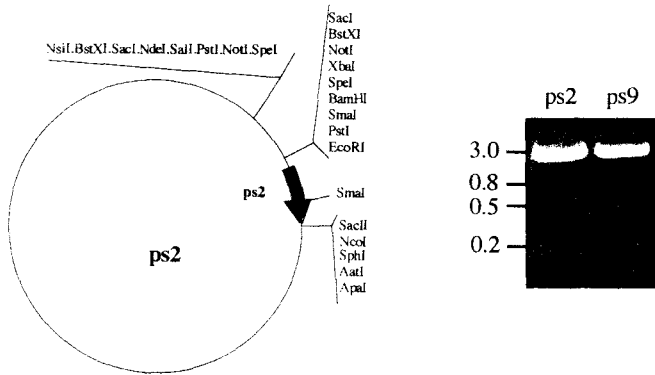
**Figura 35. Mutagénesis por PCR.** (A). Esquema de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos pTE y M13R. (B). Resultado de las reacciones: carriles 1 y 2, reacciones con DNA y los dos oligonucleótidos; carril 3, reacción sin oligonucleótidos; carril 4, reacción sin DNA molde.

La banda se aisló por Gene-clean<sup>®</sup>, y se subclonó en el plásmido pGEM-T, obteniéndose una serie de colonias que fueron analizadas por PCR para detectar la presencia de inserto. De diez colonias analizadas, sólo dos contenían el inserto buscado, que se presentaba como una doble banda en las reacciones de PCR de las colonias (figura 36-A). Las dos colonias con inserto fueron, además, analizadas por minipreparaciones de DNA plasmídico y digestión con *SmaI*, comprobándose así la existencia en ambas de una banda de 200 pb (figura 36-B).

(A)



(B)



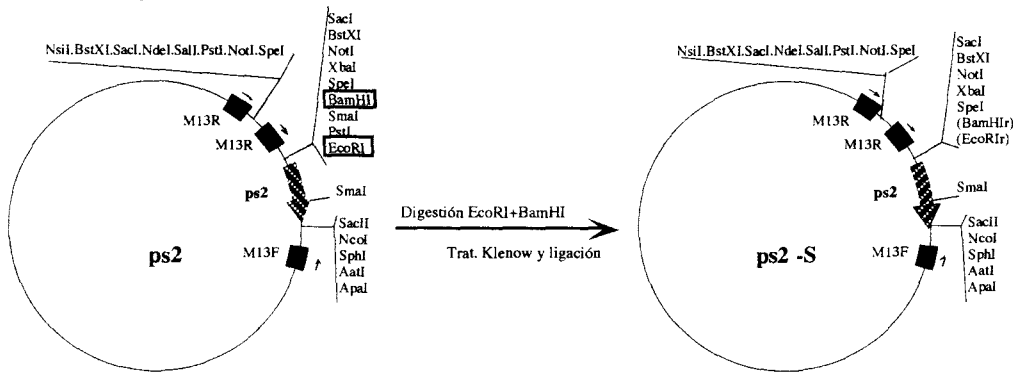
**Figura 36: Clonación del fragmento del péptido señal de pTE28.1 amplificado por PCR en pGEM-T. (A).** Aparición de dos bandas en las amplificaciones por PCR con los cebadores M13F y M13R de las colonias positivas. **(B).** Esquema del plásmido construido y digestión con *SmaI* de los plásmidos positivos ps2 y ps9.

Finalmente, las construcciones ps2 y ps9 se secuenciaron, y la secuencia obtenida se correspondía con la original, salvo en la zona de la diana de la enzima *SmaI* que se había introducido con el oligonucleótido. El trabajo se continuó con el transformante ps2.

### 2.2.3. Construcción psCHIT42.

#### 2.2.3.1. Eliminación de la diana *SmaI* del polilinker de ps2.

La construcción ps2 presentaba dos dianas de la enzima *SmaI*, lo cual impedía fusionar otros fragmentos de DNA al péptido señal. Se procedió, pues, a eliminar la diana *SmaI* del polilinker del plásmido ps2 como se indica en la figura 37. La construcción resultante se denominó ps2-S.



**Figura 37: Eliminación de la diana *SmaI*.**

### 2.2.3.2. Construcción ppsCHIT42.

Esta construcción se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar, se unió al péptido señal (clon ps2S) el inserto de la construcción pERV-1 mut. Un segundo paso consistió en unir a éste el resto del clon de la quitinasa, es decir, desde la diana *EcoRV* hasta el extremo 3' del cDNA, obteniéndose de este modo el plásmido ppsCHIT42. Todo el proceso se esquematiza en la figura 38.

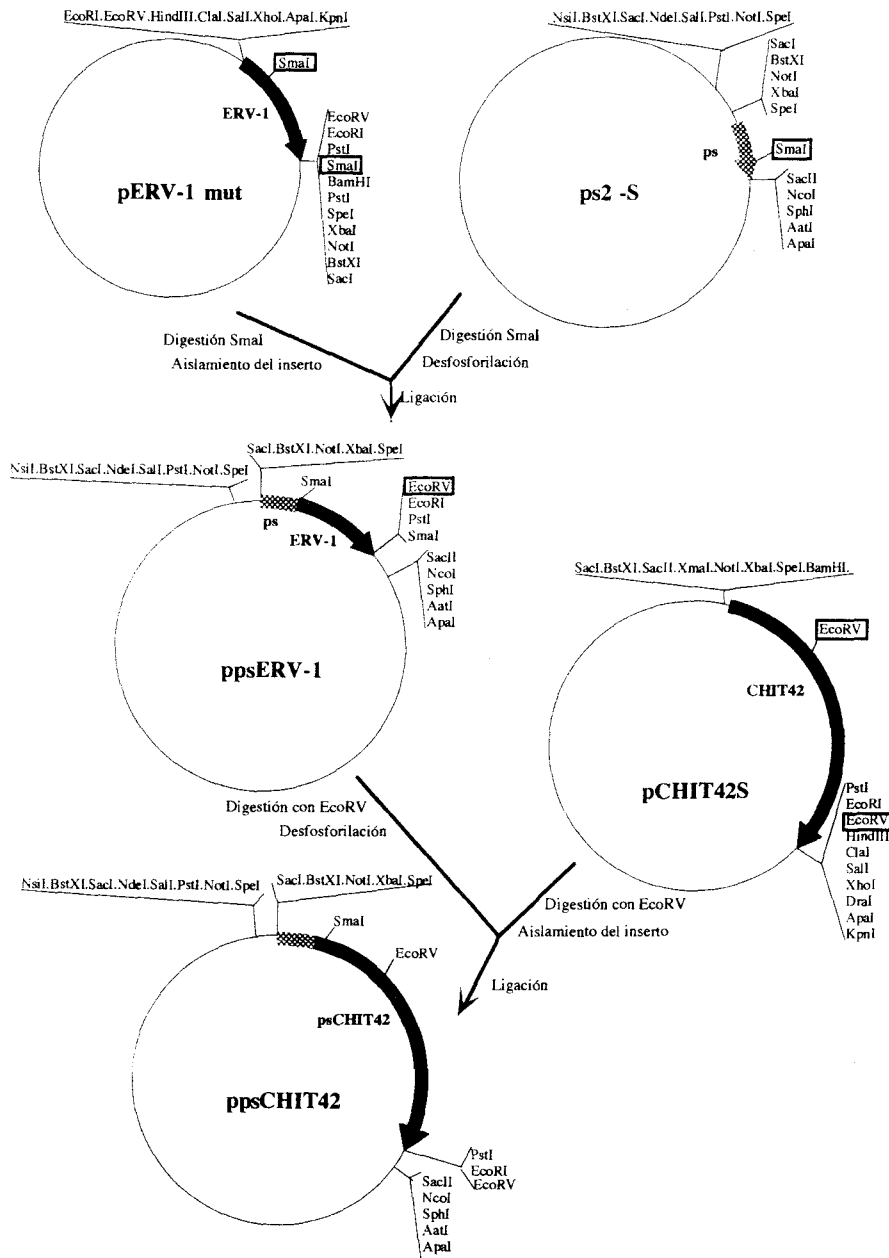


Figura 38. Esquema de la realización de la construcción ppsCHIT42.

### 2.2.3.3. Construcción psCHIT42 en pBI221 y en Bin19.

Las construcciones para transformar plantas con el gen quimérico psCHIT42 se realizaron de forma análoga a las de las plantas CHIT42. El plásmido ppsCHIT42 se digirió con las enzimas *Xba*I y *Ssp*I, y el inserto obtenido se ligó con el vector pBI221 al que se le había eliminado el gen GUS por digestión con *Xba*I y *Sac*I. El extremo de la diana de *Sac*I se trató con T4DNA polimerasa para hacerlo romo y facilitar la ligación.

Algunos de los transformantes obtenidos fueron analizados por minipreparaciones de DNA plasmídico y digestión de los plásmidos con *Xba*I y *Bam*HI. De entre las colonias positivas, se eligió una que contenía el gen en la orientación adecuada.

A continuación, el cassette que contenía el promotor, gen y terminador se separó del plásmido pBI221-psCHIT42 por digestión con *Eco*RI y *Hind*III, y fue introducido en pBin19 previamente digerido con las mismas enzimas y desfosforilado. El esquema completo de la realización de la construcción se presenta en la figura 39.

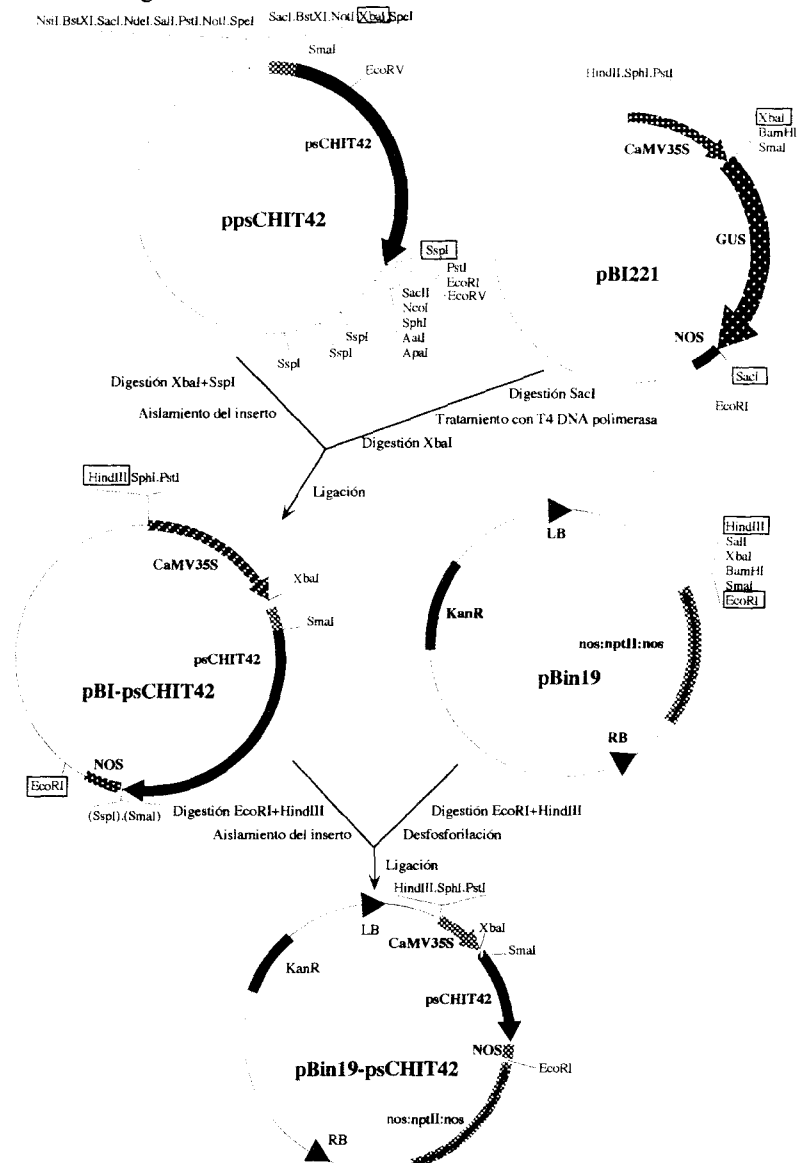


Figura 39: Construcciones pBI-psCHIT42 y Bin19-psCHIT42

La presencia del cDNA CHIT42 en los transformantes Bin19-psCHIT42 se determinó por hibridación de colonias con el fragmento *Apal-SacI* del plásmido pPCR3CHIT42. De varias colonias positivas, se eligió una para la extracción del DNA plasmídico y la digestión con *EcoRI* y *HindIII*. De este modo, se confirmó la existencia del cassette CaMV35S-psCHIT42-NOS en Bin19.

El plásmido pBin19-psCHIT42 se introdujo en *A. tumefaciens* mediante transformación. La única colonia que creció en presencia de kanamicina y estreptomycinina fue analizada por digestión de su DNA plasmídico con *EcoRI* y *HindIII*, que reveló la presencia del mismo inserto de 3 kb presente en el plásmido pBin19-psCHIT42

#### 2.2.4. Transformación de plantas de tabaco con la construcción psCHIT42.

Unos 100 discos de hojas de tabaco fueron cocultivados con el transformante de *Agrobacterium* que contenía la construcción Bin19-psCHIT42. Al igual que en el caso de las plantas CHIT42, unos 40 brotes fueron elegidos para el enraizamiento en medio selectivo. Entre los que lograron enraizar, se eligieron 18, que se pasaron a tierra, manteniendo una réplica en cultivo *in vitro*.

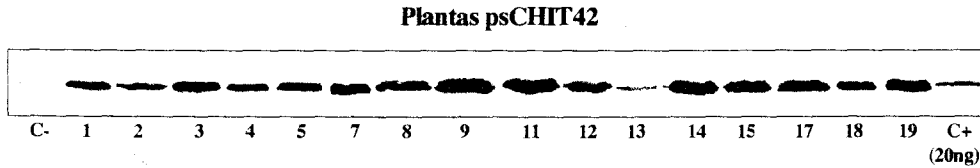
La presencia del cDNA CHIT42, y el número de copias que contenían las plantas transgénicas se analizaron como en el caso de las plantas CHIT42. El Southern-blot del DNA total de las plantas digerido con *EcoRI* revela una serie de bandas cuyo número corresponde a las integraciones del gen en la planta (datos no mostrados). El test de segregación de la F1 en MSKan300 permite confirmar estos datos (figura 40).

Planta psCHIT42	Segregación F1
1	1
2	1
3	2
4	>2
5	1
7	1
8	1
9	2
10	1
11	ND
12	1
13	ND
14	1
15	ND
17	1
18	ND
19	2

Figura 40. Test de segregación de las plantas psCHIT42.

Las plantas se analizaron por western para detectar la presencia de la proteína psCHIT42 (figura 41).



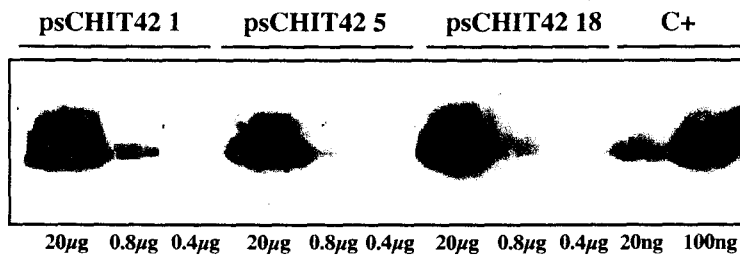


**Figura 41. Western de las plantas psCHIT42.** C+ corresponde a la proteína CHIT42 purificada a partir de sobrenadantes de cultivos de *Trichoderma* inducidos por quitina.

Como se observa en la figura 41, en los extractos de hojas de plantas transgénicas, el anticuerpo anti-CHIT42 reconoce específicamente una proteína del mismo tamaño que la proteína CHIT42 aislada de *Trichoderma*. Esta proteína está ausente en plantas sin transformar.

### 2.2.5. Expresión de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas psCHIT42.

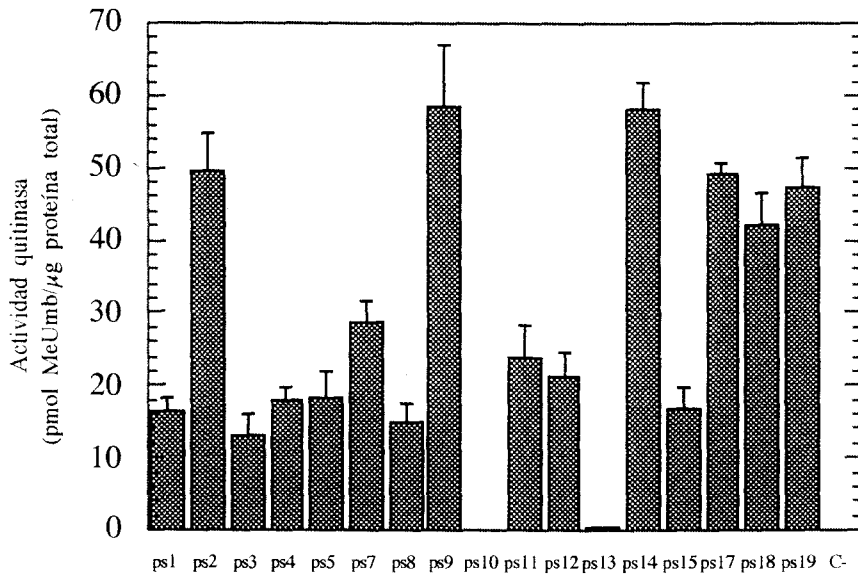
El porcentaje de expresión de la proteína CHIT42 en las plantas psCHIT42 fue determinado, al igual que en las plantas CHIT42, por análisis western en los que se resolvían diferentes cantidades de extractos proteicos de plantas y concentraciones determinadas de la proteína CHIT42 purificada. La intensidad de las bandas que se obtenían era cuantificada con ayuda de un analizador de imágenes (programa NIH Image). En la figura 42 se muestran los resultados: la proteína heteróloga constituye en las plantas transgénicas entre un 0.1 y un 0.3% de la proteína total, lo que constituye un orden de magnitud más que los niveles obtenidos para las plantas CHIT42.



**Figura 42: Western de cuantificación de las plantas psCHIT42.** C+ corresponde a la proteína CHIT42 purificada a partir de sobrenadantes de cultivos de *Trichoderma* inducidos por quitina. Debajo del filtr se señala la cantidad de proteína CHIT42 purificada que se ha cargado en cada carril, así como las cantidades de proteína total de extractos proteicos de hojas de las plantas transgénicas que se ha utilizado en cada caso.

### 2.2.6. Determinación de la actividad quitinasa de las plantas transgénicas psCHIT42.

Los niveles de actividad quitinasa que presentaban las plantas transgénicas psCHIT42 en condiciones control fueron determinados mediante el método de la MeUmbQ, cuyos resultados se presentan en la figura 43.

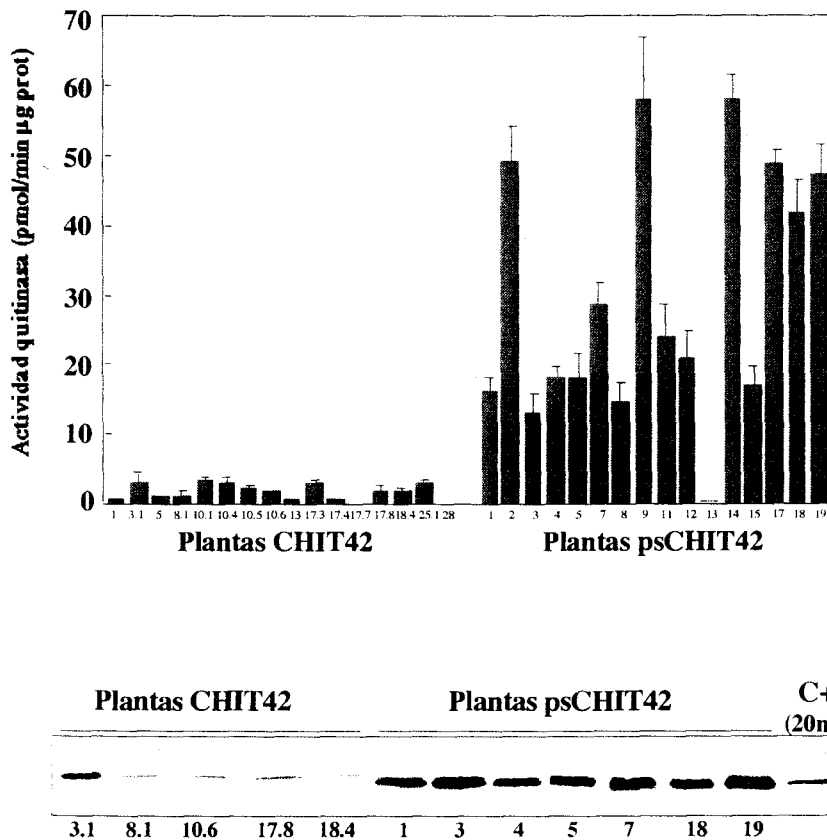


**Figura 43. Gráfica de actividades quitinasa de las plantas psCHIT42.**

En las plantas psCHIT42, del mismo modo que en las plantas CHIT42, los niveles de actividad quitinasa de cada planta son proporcionales a los niveles de expresión de la proteína (compárense las actividades y los niveles de expresión de la proteína de las plantas 13 y 14, por ejemplo). Al igual que los niveles de proteína, la actividad quitinasa que presentan las plantas psCHIT42 es aproximadamente 10 veces más que la determinada para las plantas CHIT42, lo cual se traduce en que las plantas transgénicas que portan el gen quimérico tienen, en condiciones basales, entre 20 y 60 veces más actividad quitinasa que las plantas sin transformar o el tampón fosfato solo.

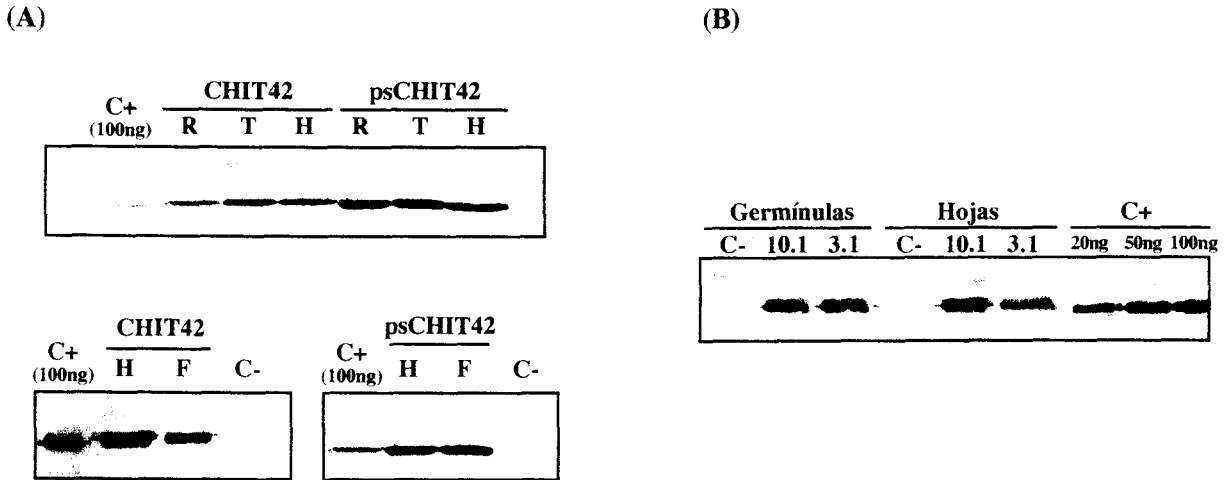
### **2.2.7. Resumen: análisis comparativo de los niveles de expresión y la actividad quitinasa de las plantas CHIT42 y psCHIT42.**

En la figura 44 se confrontan las actividades quitinasa de las plantas CHIT42 y psCHIT42 con los resultados de los análisis western respectivos. En líneas generales, se observa una correlación positiva entre la cantidad de proteína expresada y la actividad presentada por cada planta. Las diferencias entre las plantas transformadas con las dos diferentes construcciones se hacen muy patentes, siendo la expresión de la proteína heteróloga y la actividad quitinasa de las plantas psCHIT42 unas 10 veces mayor que la que exhiben las plantas CHIT42.



**Figura 44: Gráfica conjunta actividad-western.** Las proteínas que se utilizaron para ambos ensayos fueron extraídas en tampón fosfato, a partir de hojas expandidas de las plantas control (C-) y transgénicas. Para los ensayos de actividad quitinasa se recogía siempre la tercera hoja de cada planta.

En el análisis western de la figura precedente se observa la diferencia de movilidad electroforética que presenta la proteína expresada por las plantas CHIT42, que no exhiben las plantas psCHIT42. Este hecho, como se ha mencionado anteriormente, sugiere que las plantas CHIT42 no procesan correctamente la proteína heteróloga. No obstante, y con el objeto de averiguar si este efecto era propio de hojas, y no aparecía en otros órganos o etapas del desarrollo de las plantas, se llevó a cabo un análisis tipo western de extractos proteicos totales de raíces, tallos, hojas y flores de las plantas CHIT42 y psCHIT42, así como de germínulas de 15 días de edad de las plantas CHIT42. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 45.

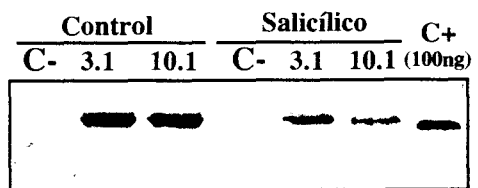


**Figura 45. Western de diferentes órganos y etapas del desarrollo de las plantas transgénicas.** (A). Western correspondiente a 20 mg de las proteínas totales de hojas (H), tallos (T), raíces (R) y flores (F) de las plantas CHIT42 10.1 y psCHIT42 11. (B). Western correspondiente a 20 mg de extractos de germinulas de plantas CHIT42 y 40 mg de extractos de hoja de las mismas plantas. C+ corresponde a las cantidades indicadas de la proteína CHIT42 aislada a partir de sobrenadantes de cultivos de *T. harzianum* inducidos con quitina. C- corresponde a extractos de plantas sin transformar.

Como se puede observar, la movilidad electroforética de la proteína CHIT42 expresada por las plantas CHIT42 permanece invariable en los extractos de los diferentes órganos de las plantas adultas, así como en las germinulas.

El tratamiento con ácido salicílico es capaz de inducir una serie de proteínas en las plantas pertenecientes al grupo de las PR. Entre estas PR se han descrito proteasas específicas; se pensó que posiblemente alguna de ellas podría procesar la proteína CHIT42 expresada por las plantas transgénicas. Por lo tanto, se pulverizaron hojas de plantas control y de plantas transgénicas CHIT42 con ácido salicílico 1mM en metanol al 3.6%, y al cabo de 48 horas, se extrajeron proteínas de ellas. Los resultados de los análisis western se presentan en la figura 46.

**Figura 46. Western de las plantas CHIT42 tratadas con ácido salicílico.** Las plantas control se representan como C-; C+ corresponde a la cantidad indicada de la proteína CHIT42 purificada a partir de sobrenadantes de cultivos de *T. harzianum* inducidos con quitina. Los controles se realizaron pulverizando hojas de las diferentes plantas con metanol al 3.6%.



Nuevamente, se puede constatar que la movilidad electroforética de la proteína CHIT42 expresada en las plantas CHIT42 no varía con respecto a los demás órganos y condiciones ensayados.

## 2.3. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CHIT42 EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.

### 2.3.1. Solubilización de la proteína en diferentes tampones.

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas CHIT42 y psCHIT42 habían sido extraídas en TF para realizar los ensayos de actividad quitinasa. Dadas las diferencias de expresión de la proteína heteróloga y actividad quitinasa que se encontraban en los dos tipos de plantas, se planteó la posibilidad de que existieran diferencias en la solubilidad de las proteínas CHIT42 y psCHIT42 a causa de la diferente eficacia en la secreción dirigida por los respectivos péptidos señal. De hecho, se pensaba que el péptido señal fúngico era mucho menos eficiente en tabaco que el de tomate, y que la mayor parte de la proteína expresada por las plantas CHIT42 permanecía en el interior de las células, asociada a alguna estructura membranosa del aparato secretor.

Una primera aproximación para solventar este problema consistió en un análisis de las proteínas que se extraen en tampón fosfato (TF), acuoso, y en tampón Laemmli (SB), que contiene SDS y que, por lo tanto, extrae con más eficacia proteínas asociadas a estructuras membranosas. Se extrajeron proteínas de plantas CHIT42 y de plantas psCHIT42 en ambos tampones, y se hicieron ensayos de western. Los resultados se muestran en la figura 47, en la que se aprecia que, tanto en el caso de las plantas CHIT42 como en el de las psCHIT42, en ambos tampones se obtiene la misma cantidad de la proteína heteróloga.

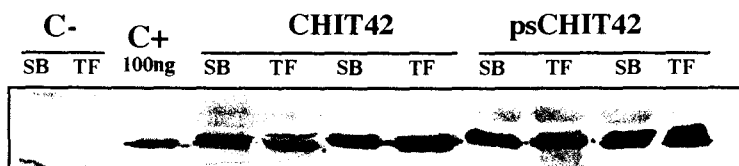


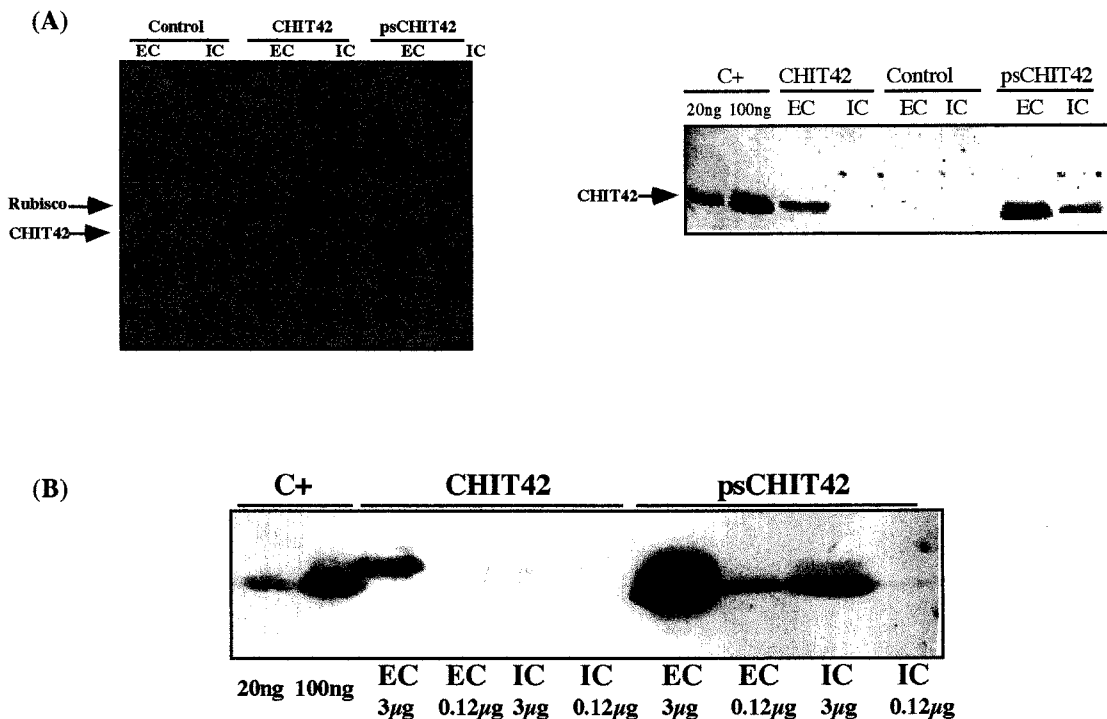
Figura 47. Western de extractos en tampón Laemmli (SB) y en tampón fosfato (TF).

### 2.3.2. Localización de la proteína en diferentes extractos celulares.

Un paso más en la elucidación del problema planteado consistió en la obtención de extractos proteicos extra e intracelulares de las plantas transgénicas de ambos tipos, y la detección de CHIT42 por ensayos western.

Se extrajeron proteínas extracelulares e intracelulares (EC e IC, respectivamente) de plantas no transformadas y de las plantas CHIT42 10.1 y psCHIT42 11, y se detectó mediante western la fracción en donde se localizaba la proteína CHIT42. En principio, se resolvieron 3µg de proteínas totales EC e IC. En este primer western (figura 48-A), se observa proteína en la fracción EC de ambos tipos de plantas, si bien la planta psCHIT42 presenta mucha mayor cantidad. De hecho, en esta planta se observa también proteína en la fracción IC. Un segundo western (figura 48-B), en el que se resolvieron diferentes cantidades de proteína total, reveló que ambos tipos de plantas presentan CHIT42 tan sólo en la fracción EC. La banda que aparece en el extracto IC de la planta psCHIT42 es una consecuencia del método de fraccionamiento, que se basa en la infiltración y la extracción del líquido intercelular (ver apartado 14.1.2. de *Materiales y Métodos*), y mediante el cual se obtienen extractos EC con una pureza que oscila entre el 60-80%. De este modo, y

dada la enorme cantidad de proteína que expresan las plantas psCHIT42, es posible que algunas proteínas extracelulares se detecten en la fracción IC por western.



**Figura 48: Western de extractos de proteínas extracelulares (EC) e intracelulares (IC) de las plantas transgénicas.**

### 2.3.3. Localización de la proteína CHIT42 en impresiones de tejido en filtros de nitrocelulosa.

Un paso adicional en la localización de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas consistió en su detección mediante anticuerpos en impresiones de tejidos en filtros de nitrocelulosa, o “tissue-printing”.

#### 2.3.3.1. Purificación del anticuerpo.

En ensayos de localización de proteínas en cortes o en impresiones de tejido es conveniente disponer de un suero que detecte específicamente la proteína que se está estudiando y que no presente reacción cruzada con otras proteínas. De este modo, se evita ruido de fondo que entorpezca la interpretación de los resultados.

Para la purificación del anticuerpo anti-CHIT42 por afinidad se expresó la proteína CHIT42 en bacterias, según un método que permitiera su fácil purificación. Para ello, se clonó el cDNA en el plásmido pGEX 4T-2 (consultar el apartado 17 de *Materiales y Métodos*), y se intentó purificar la proteína CHIT42 a partir de extractos proteicos de bacterias que sobreexpresaban la proteína híbrida GST-CHIT42. Desgraciadamente, no fue posible obtener ni la proteína CHIT42 sola, ni la proteína de fusión GST-CHIT42.

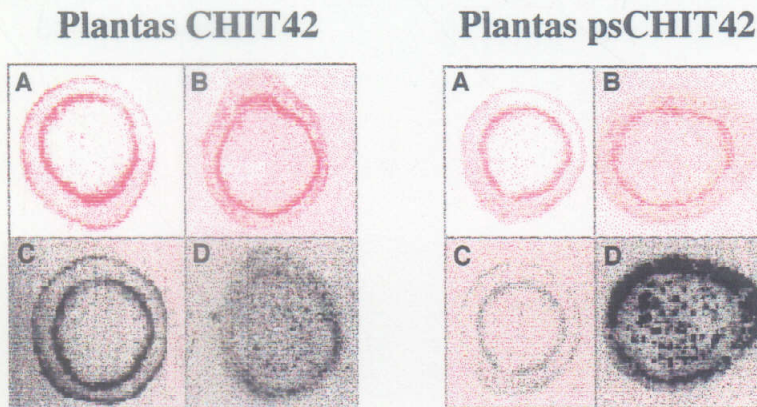
Ante esta dificultad, se utilizó el extracto total de células inducidas con IPTG, se resolvió en un gel de proteínas, y se transfirió a un filtro de inmobilon. Tras teñirlo con Ponceau S e identificar la banda correspondiente a la proteína de fusión, ésta se recortó y

constituyó el antígeno para la purificación del anticuerpo anti-CHIT42 a partir del suero de conejo. En este experimento, se utilizó una dilución del anticuerpo original de 1:50, en un volumen total de 3 ml (ver apartado 15.1.2. de *Materiales y Métodos*).

### 2.3.3.2. Inmunolocalización de la quitinasa CHIT42 en impresiones de tejido en filtros de nitrocelulosa.

Una vez purificados los anticuerpos, se realizaron impresiones de tallos y peciolo de plantas control y transgénicas de los dos tipos sobre filtros de inmovilización. En la figura 49 se muestran los resultados obtenidos tras la incubación con el anticuerpo purificado y el revelado con fosfatasa alcalina para cada una de las plantas analizadas. Las diluciones utilizadas en cada caso son diferentes, puesto que las plantas CHIT42 presentan mucha menos cantidad de quitinasa y tan sólo se puede apreciar reacción cuando se utilizan bajas diluciones del anticuerpo.

La reacción con el anticuerpo es tanto más marcada cuanto más lo es también la señal en Ponceau S, que tiñe las proteínas unidas al filtro. Los resultados indican que la proteína CHIT42 se localiza de forma homogénea en todas las células del tallo de las plantas transgénicas, y que no existe acumulación preferente en ningún tipo celular. Además, el patrón de acumulación de la quitinasa en las plantas CHIT42 y psCHIT42 es similar, si bien se puede apreciar la notable diferencia entre la cantidad de proteína que se detecta en cada una de ellas, mucho menor en las plantas CHIT42 que en las psCHIT42.



**Figura 49: Inmunolocalización de la proteína CHIT42 en impresiones de tallo de las plantas CHIT42 10.1, psCHIT42 18 y control en filtros de nitrocelulosa.** El anticuerpo purificado se utilizó a una dilución de 1:20 para las plantas CHIT42 y sus respectivos controles, y a 1:100 para las plantas psCHIT42 y sus respectivos controles.

### 2.3.4. Inmunolocalización de la proteína CHIT42 al microscopio electrónico en las plantas transgénicas.

Estos experimentos fueron realizados por Simona Muccifora y el Dr. Paolo Gori del Istituto di Biologia Generale de la Universidad de Siena. Se sembraron en medio MS (con K300 en el caso de plantas transformadas) diversas plantas control (sin transformar y transformadas con el vector control pBI101) y transgénicas CHIT42 y psCHIT42. Al cabo de unos 10 días se tomaron las germínulas y se cortaron hojas tal como se describe en el apartado 18 de *Materiales y Métodos*. Las plantas que se utilizaron en estos

experimentos se eligieron según dos criterios: el número de copias del gen introducido y la actividad quitinasa que presentaban.

Plantas	Número de copias	Actividad quitinasa (pmol MeUmb/ $\mu$ g prot total)
Sin transformar	0	0
pBI 101.1	2	0
CHIT42 1	3	1
CHIT42 3.1	1	3.7
CHIT42 17.4	2	0.9
psCHIT42 2	1	50
psCHIT42 9	2	58

**Tabla 15 : Plantas utilizadas para la localización de la proteína CHIT42 al microscopio electrónico.** El plásmido pBI101 contiene todos los elementos para la integración del T-DNA, donde se encuentra la secuencia correspondiente a la proteína GUS acabada en el terminador NOS. Las plantas transformadas con este plásmido se usaron también como controles negativos.

En la figura 50 se muestra una serie de microfotografías al microscopio electrónico de la localización mediante anticuerpos de la proteína CHIT42. La quitinasa se encuentra en los espacios intercelulares tanto en las plantas CHIT42 como en las plantas psCHIT42. Estos datos confirman inequívocamente que la proteína fúngica se excreta en las plantas de tabaco transgénicas.



**Figura 50. Microfotografías de las plantas CHIT42 y psCHIT42.**

#### **2.4. ACUMULACIÓN DEL mRNA CHIT42 EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

Los datos que se habían obtenido en este momento demostraban que tanto la proteína nativa como la quimérica expresadas por las plantas transgénicas se localizaban en el espacio intercelular. Por lo tanto, las diferencias observadas en cantidad de proteína expresada y actividad quitinasa de los dos tipos de plantas no podían ser explicadas por



una acumulación diferencial de la proteína que causaran una insolubilización de la misma en el caso de las plantas CHIT42.

Una nueva estrategia para tratar de averiguar las causas de las diferencias mostradas por ambos tipos de plantas transgénicas consistió en examinar los niveles de mRNA que presentaban. Si bien las construcciones utilizadas para transformar las plantas portaban en ambos casos el mismo promotor (CaMV35S), de expresión prácticamente constitutiva en plantas, las zonas 5' y 3' no codificantes no eran iguales (ver figura 30). Existen secuencias reguladoras de la transcripción y de la estabilidad de los mRNAs situadas en las zonas 5' y 3' no codificantes de algunos genes. De hecho, en esta última es donde se han encontrado secuencias implicadas en la estabilidad de los mensajeros (revisado por Green, 1993). Por lo tanto, se realizó un experimento de northern con RNA extraído de varias plantas de ambos tipos. El resultado, mostrado en la figura 51, demuestra que los niveles de mRNA de las plantas CHIT42 son mucho menores que los que presentan las plantas psCHIT42, explicándose de este modo las diferencias en la cantidad de proteína expresada.

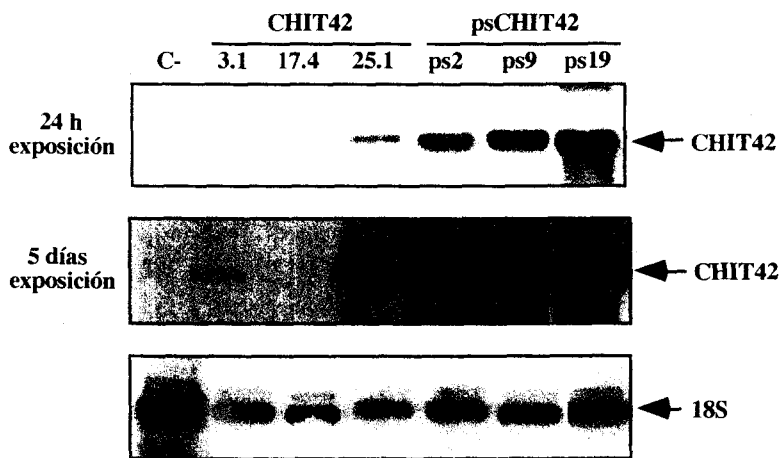


Figura 51. Northern de las plantas CHIT42 y psCHIT42.

### 3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.

Se llevaron a cabo experimentos de resistencia al ataque del hongo *Rhizoctonia solani* de plántulas de unos 15 días de edad, y de plantas adultas, según se describe en el apartado 20 de *Materiales y Métodos*.

Las plantas escogidas, así como sus características más relevantes, se esquematizan en la tabla 16.

Planta	Número de copias <i>chit42</i>	Actividad quitinasa (pmol MeUmb/min µg prot. total)
Sin transformar (control)	0	0
CHIT42 3.1	1	3.33+-0.93
CHIT42 8.1	1	3.53+-1.85
CHIT42 10.1	2	12.17+-6.64
CHIT42 17.3	2	3.42+-0.32
CHIT42 17.4	2	0.53+-0.28
CHIT42 18.4	1	1.76+-0.52
psCHIT42 2	1	41.43+-8.77
psCHIT42 4	>2	17.95+-1.82
psCHIT42 9	2	54.45+-11.48
psCHIT42 10	1	0
psCHIT42 11	ND	34.43+-11.03
psCHIT42 14	1	47.64+-6.79
psCHIT42 17	1	41.04+-8.15
psCHIT42 19	2	41.16+-6.88

Tabla 16. Plantas utilizadas para el ensayo de resistencia de germínulas frente al ataque de *R. solani*.

Las cajas con *R. solani* se prepararon como se describe en el apartado 20.1.1. de *Materiales y Métodos*. Se utilizaron indistintamente las estirpes 1556 y D2, cuya virulencia había sido comprobada previamente en el laboratorio del Dr. Lorito (Nápoles, Italia).

En cada experimento se utilizaron de 100 a 200 plantas de cada tipo (control y cada una de las transgénicas). Las condiciones de los ensayos se describen en el apartado 20.1.2. de *Materiales y Métodos*.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 17 y en la figura 52. Si bien cada ensayo (A-G) se evaluó cada 3 ó 4 días durante aproximadamente un mes, se ha seleccionado una serie de datos no redundantes, y que muestran dos medidas de cada ensayo, una tras tiempos cortos de infección (4-10 días), y otra tras periodos más largos (11-22 días).

La figura 52 muestra una serie de gráficas en las cuales los datos se han dividido en dos tipos de medidas: una, a tiempos cortos, que, según el experimento, oscila entre 4 y 10 días, y otra, tras incubar las plantas con *Rhizoctonia* durante un periodo más largo, de 10 a 22 días. En el panel A se pueden observar las medidas de las diferencias de

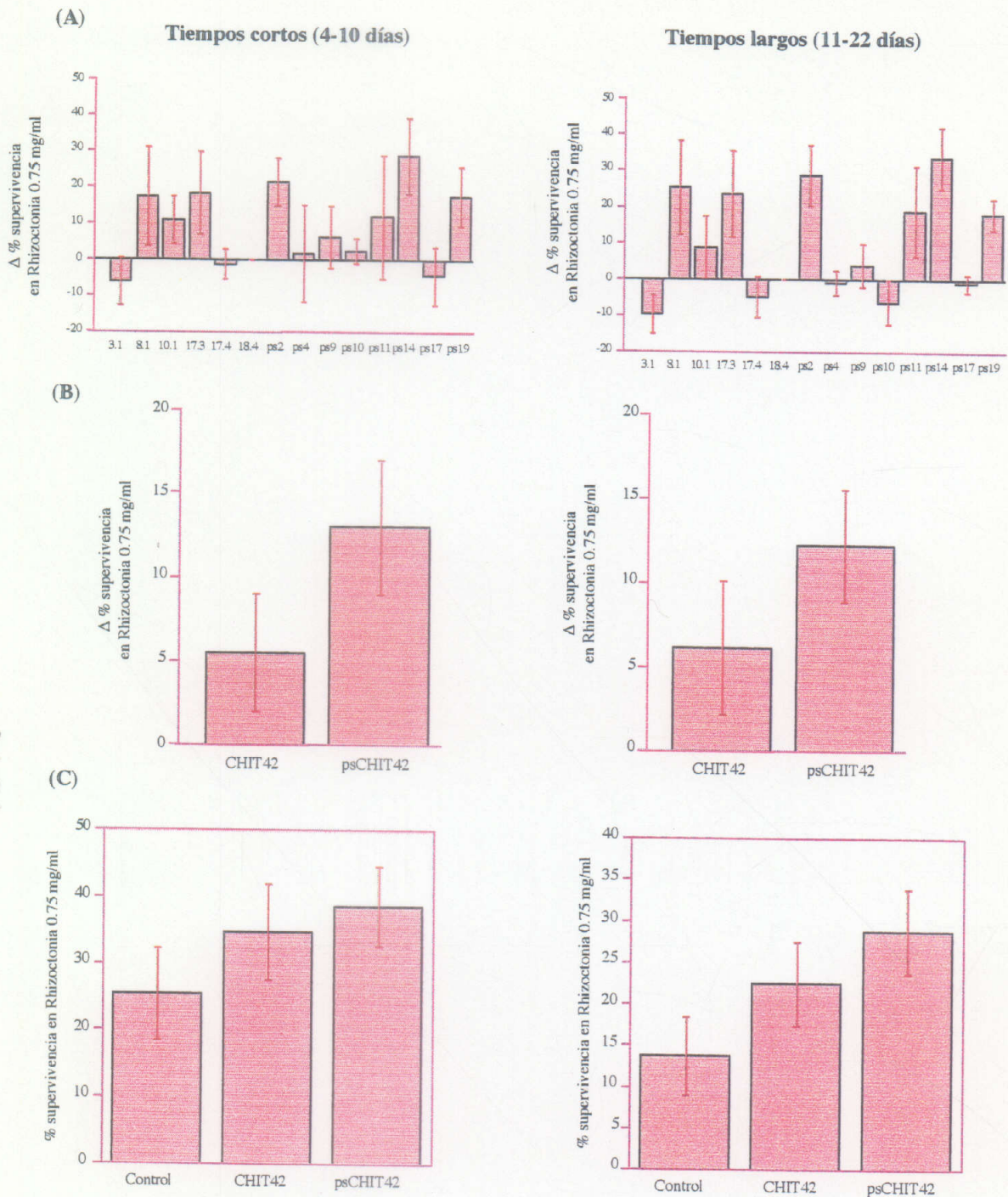
supervivencia en cada ensayo de las plantas transgénicas con respecto a las plantas control correspondientes. Las medidas negativas corresponden a experimentos en los que la supervivencia de la planta transgénica en medio con *R. solani* era menor que la de la planta control del experimento. Por otra parte, se han agrupado todos los datos correspondientes a las plantas CHIT42 y a las plantas psCHIT42, tanto las diferencias con respecto a los controles correspondientes (apartado B de la gráfica), como los valores absolutos, incluidos los de los controles (apartado C de la gráfica). La planta transformante ps10 no presenta proteína CHIT42 ni actividad quitinasa, si bien es resistente a kanamicina. Se ha utilizado, por lo tanto, como un control adicional del experimento.

## Plantas CHIT42

## Plantas psCHIT42

Experimento	Días de infección	Control	3.1	8.1	10.1	17.3	17.4	18.4	ps2	ps4	ps9	ps11	ps14	ps17	ps19	ps10
A	7	43.3	19.0				31.7		65.5		33.0		65.1		54.8	
	13	37.3	19.0				30.5		65.6		29.5		57.0		48.8	
B	5	3.00	0.0				8.5		22.2		11.5		39.7		21.5	
	11	0.0	0.0				5.7		14.6		8.8		32.0		16.6	
C	5	46.7	53.7				51.7		85.0		75.6		100.0		83.2	
	16	31.8	20.8				18.4		75.2		43.0		81.2		58.1	
D	7	6.7	2.0				2.7		12.6		4.8		10.4		7.2	
	10	5.5	2.0				2.7		9.5		4.2		7.3		0.0	
E	7	40.0		84.0	61.6	78.6		80.0		66.3		84.0		46.0		46.0
	17	22.4		65.5	23.3	55.3		52.0		27.0		66.0		23.5		10.0
F	10	51.0		60.0	63.0	68.0		30.0		31.0		37.0		31.0		
	22	16.0		49.0	42.0	54.0		9.0		9.0		26.0		10.3		
G	4	0.8		0.0	0.0	0.00		0.0		0.0		6.6		1.8		0.0
	11	0.0		0.0	0.0	0.00		0.0		0.0		3.3		1.8		0.0

**Tabla 17. Porcentajes de supervivencia de las plantas control y transgénicas en cajas con *R. solani* a 0.75 mg/ml.** La primera columna indica el experimento; la segunda, los tiempos de infección en días. Cada dato corresponde a los porcentajes de supervivencia de al menos 100 plantas de cada tipo. La planta ps10 constituye un control adicional del experimento (ver texto).



**Figura 52. Resistencia de las plantas transgénicas a *R. solani* 0.75 mg/ml.** (A). Diferencias en la supervivencia de cada planta control con respecto a las plantas control del experimento correspondiente (%supervivencia transgénica-%supervivencia control del ensayo). (B). Diferencias globales de supervivencia de las plantas CHIT42 y psCHIT42 respecto al control. Se han incluido los datos de tres experimentos independientes con cada planta. La planta ps10 no se ha incluido. (C). Supervivencia (%) de las plantas control y las plantas transgénicas CHIT42 y psCHIT42 en *R. solani* 0.75 mg/ml. Se han incluido los datos de tres experimentos independientes con cada planta. La planta ps10 no se ha incluido.

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN.

### 1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL cDNA CHIT42.

#### 1.1. Secuencia del clon CHIT42.

Se ha aislado un clon de cDNA cuya secuencia corresponde a la quitinasa CHIT42 previamente purificada (De la Cruz *et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos deducida contiene todos los oligopéptidos que se habían obtenido por microsecuenciación de la proteína (De la Cruz, 1994, y tabla 13 de *Resultados*), de cuyas actividades quitinasa y lítica sobre paredes de hongos se tenían evidencias bioquímicas (De la Cruz *et al.*, 1992, y apartado de *Antecedentes* de esta tesis).

La extensa homología que la secuencia obtenida presenta con otras quitinasas, y, sobre todo, con la quitinasa Chi1 del hongo fitopatógeno *A. album* a lo largo de toda la fase abierta de lectura, confirman la naturaleza de la proteína que codifica. Además, se encuentran homologías significativas con otras quitinasas de origen fúngico y bacteriano. Existe una zona especialmente conservada entre estas quitinasas, y que aparecen también en otras quitinasas de plantas, que contienen el sitio catalítico putativo. Esta zona, FDGIDIDWE, es rica en los residuos ácidos aspártico (D) y glutámico (E), y se encuentra incluida en el sitio catalítico de la quitinasa de *S. cerevisiae* (Kuranda y Robbins, 1991). Si bien se ha comprobado que la quitinasa CHIT42 no presenta actividad lisozima, Asp y Glu han sido descrito como los residuos catalíticos de lisozimas de tipo C, que son también capaces de degradar la glicol-quitina (Watanabe *et al.*, 1992). El mecanismo de acción propuesto de estas proteínas se basa en datos estructurales y químicos. Se ha sugerido que el Glu-35 actúa como un catalizador ácido, que dona un protón al oxígeno glucosídico, y el Asp-52 estabiliza electrostáticamente el ión carbonio intermediario que origina (Blake *et al.*, 1965, Malcolm *et al.*, 1989).

Rouvinen *et al.* (1990) proponen que el sitio catalítico de la celobiohidrolasa CBH-II de *T. reesei* está constituido por dos residuos de Asp. Sin embargo, el dato más concluyente de la función catalítica de esta zona altamente conservada lo constituye la identificación de los aminoácidos Glu-204 y Asp-200 como los residuos catalíticos de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans*, y cuyos equivalentes en CHIT42 se encuentran en las posiciones Glu-137 y Asp-133 (Watanabe *et al.*, 1993). El papel de los otros dos residuos de Asp presentes en la misma región no ha sido determinado aún, pero se ha sugerido que podrían actuar cooperativamente con el Asp-200 de la quitinasa A1 (Watanabe *et al.*, 1993).

El alineamiento de las quitinasas revela otra zona muy conservada entre las diversas proteínas (ver figura 16 de *Resultados*). Esta región contiene dos residuos de Gly y uno de Ser que aparecen en todas las proteínas analizadas. El papel de la Ser-160 de la quitinasa A1 de *B. circulans* ha sido analizado por mutagénesis, y los resultados muestran que, si bien la actividad se reduce significativamente, la Km permanece invariable. Este residuo participa, posiblemente, en el mantenimiento de la estructura del sitio catalítico (Watanabe *et al.*, 1993).

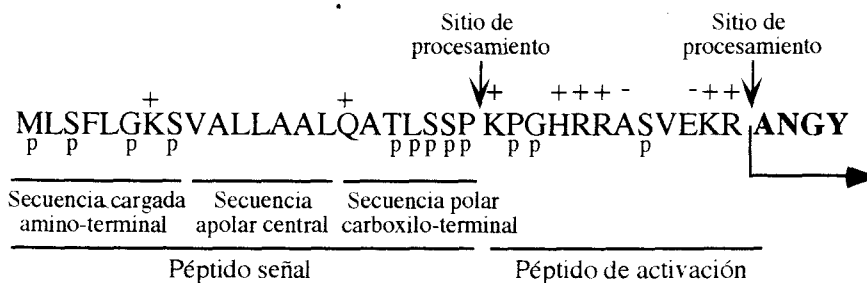
La secuencia amino terminal de la proteína CHIT42 deducida del clon CHIT42 no coincide con la obtenida a partir de los datos de microsecuenciación de la proteína

excretada al medio de cultivo por *T. harzianum*. Ésta comienza en el aminoácido situado en la posición 35, y los 34 aa precedentes están organizados en dos bloques bien definidos, según la secuencia y el perfil de hidrofobicidad (fig 15 de *Resultados*). Un primer bloque, que comprende los 22 primeros aminoácidos, es muy hidrofóbico, y presenta otras características estructurales típicas de un péptido señal: carga positiva en el extremo amino terminal, una secuencia interna de aa hidrofóbicos, y una secuencia amino terminal polar, donde se encuentra el sitio de procesamiento (figura 53) (von Heijne, 1984). El péptido señal permite a la enzima CHIT42 atravesar los orgánulos celulares encargados de la secreción.

A continuación del péptido señal, una secuencia hidrofílica de 12 aminoácidos precede al primer aminoácido de la proteína madura, la Ala de la posición 35 (figura 53). Dicha secuencia acaba en los aminoácidos Lys-Arg (KR), que constituyen la diana específica para la endoproteasa Kex2. Esta endoproteasa se encontró en levaduras, donde es esencial para el procesamiento del pre-profactor alfa, y es capaz de hidrolizar el enlace peptídico inmediatamente posterior a las secuencias dibásicas Arg-Arg o Lys-Arg (Julius *et al.*, 1984). Se han descrito endoproteasas tipo Kex2 en numerosos organismos, desde hongos hasta *Drosophila*, *Xenopus* y mamíferos (Brenan y Peach, 1988; Thomas *et al.*, 1988, 1990, 1991; Fuller *et al.*, 1989; Germain *et al.*, 1990; Seidah *et al.*, 1990; Smeeks y Steiner, 1990; Brenner y Fuller, 1992; Hayflick *et al.*, 1992). En general, esta enzima está muy conservada, y participa en procesos asociados con el procesamiento de prohormonas polipeptídicas. Recientemente se han encontrado evidencias de actividad endoproteasa tipo Kex2 en plantas (Kinai *et al.*, 1995).

Algunas quitinasas fúngicas se activan tras la incubación con proteasas (Adams *et al.*, 1993). En *Rhizopus oligosporus*, las quitinasas necesitan procesamiento amino y carboxilo terminal para su funcionamiento (Yanai *et al.*, 1992), y al menos una quitinasa de *Mucor mucedo* es activada tras un tratamiento con proteasas (Humphreys y Gooday, 1984). La actividad quitinasa de extractos de *Streptomyces olivaceoviridens* aumenta considerablemente cuando se someten a tratamientos con proteasas (Blaak *et al.*, 1993). Finalmente, ciertas proteasas pueden activar de forma muy efectiva algunas sintetetas de quitina asociadas a quitinasas de diversos hongos filamentosos (Adams *et al.*, 1993). Todos estos datos avalan la posibilidad de que la secuencia amino-terminal de CHIT42 pudiera estar implicada en un mecanismo de regulación de la actividad, siendo la proteína inactiva hasta que una endoproteasa tipo Kex2 elimine el péptido de activación una vez la quitinasa haya sido excretada. Tanto la endoquitinasa Chi1 de *A. album* como la endoproteasa Prb1 y las  $\beta$ -glucanasas BGN16.2 y BGN13.1 (Geremía *et al.*, 1993; Lora *et al.*, 1995; De la Cruz *et al.*, 1996) de *T. harzianum*, entre otras proteínas fúngicas, presentan esta señal de procesamiento.





**Figura 53: Secuencia amino-terminal de la proteína CHIT42.** Se señalan los aminoácidos cargados positivamente (+), los que poseen carga negativa (-), y aquellos cuyo radical es polar (p). Las flechas señalan los sitios de procesamiento de los péptidos señal y de activación. Los aminoácidos en negrita pertenecen a la proteína madura.

## 1.2. Regulación de la expresión de *chit42*.

La expresión del gen *chit42* de *Trichoderma harzianum* ha sido analizada mediante análisis tipo northern. Los datos muestran la inducción del gen *chit42* en presencia de quitina y paredes de hongos, así como la aparente desrepresión por falta de glucosa. Esta última aseveración se basa en la aparición de una débil banda de hibridación en los carriles correspondientes a 0.1% de glucosa (hambre de glucosa), y en piruvato, que constituye una fuente de carbono de difícil asimilación. Sin embargo, la expresión de *chit42* en cultivos en otras fuentes de carbono de difícil asimilación, como son el acetato, el citrato o el lactato, es inapreciable en análisis northern. El cultivo de *Trichoderma* en fuentes de carbono de fácil asimilación (fructosa, glicerol) tampoco induce la expresión del gen *chit42*. Este comportamiento no es compartido por la otra quitinasa de *Trichoderma harzianum* cuyo cDNA ha sido aislado, y cuyo patrón de expresión se conoce, CHIT33 (Limón *et al.*, 1995). En este caso, la cantidad de mensajero que aparece en cultivos en glucosa 0.1% es considerablemente superior a la presente en cualquier otra condición analizada, incluido el cultivo en presencia de micelios autoclavados de hongos fitopatógenos, lo que sugiere que la transcripción de esta glucanasa está desreprimida por falta de una fuente de carbono fácilmente asimilable. Sin embargo la proteína CHIT33 no se detecta en estos cultivos. Estos datos sugieren una regulación completamente diferente para las dos quitinasas, incluyendo una regulación postranscripcional del gen *chit33* de la que, según los datos obtenidos, carece el gen *chit42*. También el gen *bgn16.2*, que codifica una  $\beta$ -1,6-glucanasa de *T. harzianum* (Lora *et al.*, 1995), presenta este fenómeno de desrepresión en glucosa al 0.1%, y los datos que se obtienen para la proteína sugieren, al igual que en el caso anterior, alguna regulación postranscripcional. La expresión de otra  $\beta$ -glucanasa de *T. harzianum*, BGN13.1, presenta un patrón similar al del gen *chit42* (De la Cruz *et al.*, 1995).

El northern presentado en la figura 18 de *Resultados* muestra claramente un efecto de represión catabólica en la regulación de la quitinasa CHIT42. Este efecto se había ya descrito para la quitinasa Chi1 de *A. album*, en la que la adición simultánea de glucosa y quitina no permite la transcripción de la quitinasa. De la Cruz *et al.* (1993), observan que la adición de glucosa a cultivos de *T. harzianum* inducidos por quitina hacen disminuir hasta casi desaparecer la actividad quitinasa excretada por el hongo. De hecho, los cultivos que contienen glucosa y quitina simultáneamente no presentan actividad quitinasa detectable a las 48 h de cultivo. Hay que resaltar, sin embargo, que las medidas de actividad no son específicas para la quitinasa CHIT42, sino que se deben a la acción de al menos 10 quitinasas diferentes (revisado por Hayes *et al.*, 1996).

Asimismo, se ha estudiado el efecto en la expresión del gen *chit42* de una serie de productos relacionados con la quitina. Los resultados muestran que existe una buena correlación entre los niveles de mRNA detectados y los niveles de actividad quitinasa previamente determinados (De la Cruz *et al.*, 1993, y apartado de *Antecedentes* de esta tesis), salvo en el caso de la GlcN, donde no se detecta mensajero de *chit42*, pero la actividad presente es comparable a la de cultivos en GlcNAc, en cuyo caso sí aparece mRNA. Estas diferencias entre el patrón de expresión de *chit42* y la actividad quitinasa excretada se pueden explicar fácilmente teniendo en cuenta nuevamente la existencia de otras quitinasas sometidas, al menos en el caso ya discutido de *chit33*, a diferentes procesos de regulación. La GlcNAc, producto de la degradación de la quitina, podría actuar como inductor de la expresión de la quitinasa CHIT42, puesto que el polímero es incapaz de penetrar en la célula, si bien no podemos descartar que, en este caso, la expresión detectada pueda deberse más bien a un efecto de desrepresión por falta de una fuente de carbono de fácil asimilación.

Por último, al investigar la presencia de mRNA CHIT42 en cultivos con micelio autoclavado de hongos micoparásitos como única fuente de carbono (figura 21 de *Resultados*), se observa una fuerte inducción del mensajero en presencia de cada fitopatógeno ensayado. La existencia de quitina en las paredes de dichos hongos, sin embargo, no puede explicar este resultado, puesto que también el oomiceto *Phytophthora infestans*, que carece de quitina en su pared, es capaz de inducir, aunque en menor medida, la expresión del gen *chit42*. Otros autores (Carsolio *et al.*, 1994) han descrito la inducción del mensajero correspondiente a la proteína CHIT42 (denominada en este trabajo Ech-42) en condiciones reales de micoparasitismo contra el hongo *Rhizoctonia solani*. En experimentos de confrontación de los dos hongos, la expresión del mensajero de *ech-42* aumenta en el momento en el que se establece el contacto, que culmina en la muerte del fitopatógeno. Estos experimentos sugieren fuertemente que esta quitinasa posee un papel relevante en el micoparasitismo. Otros datos muy reveladores a este respecto los constituye la inducción de la expresión de *chit42* en cultivos duales frente a *Botrytis cinerea*, aun en presencia de glucosa en cantidades represoras (Robert Mach, comunicación personal).

Recientemente se ha comenzado a estudiar en detalle la región promotora del gen *chit42* (o *ech-42*) (Lorito *et al.*, 1996b). Durante interacciones no micoparasitarias, o en cultivos en glucosa, el gen *chit42* no se expresa, y la proteína mediadora de la represión catabólica Cre1 interacciona con una de las cinco secuencias consenso de unión que presenta el promotor (Strauss *et al.*, 1995; Cubero y Scazzocchio, 1994). Durante la interacción micoparasitaria, otra proteína es capaz de interaccionar con otra zona diferente y adyacente al sitio Cre1 funcional. Lorito *et al.* (1996b) postulan un modelo en el que existen dos zonas del promotor con sendas señales para la unión de la proteína Cre1, que se uniría en condiciones de pre-micoparasitismo, y a la proteína “de micoparasitismo”, cuya unión desplazaría a Cre1 de su sitio y permitiría la expresión del gen *chit42* una vez establecido el proceso micoparasitario.

Otro dato de expresión interesante lo encuentran Carsolio *et al.* (1994) que observan la inducción por luz de *ech-42*, asociada a la esporulación, y que podría sugerir un papel adicional de la proteína en procesos de morfogénesis o diferenciación. De hecho, en la secuencia del promotor se encuentran dos motivos de unión de la proteína BrlA, que

modula en *Aspergillus nidulans* la expresión de ciertos genes de esporulación regulados por luz (Chang y Timberlake, 1992).

### 1.3. Presencia del gen *chit42* en otras especies de hongos micoparásitos.

El análisis Southern realizado sobre DNA del propio *Trichoderma harzianum* (figura 17 de *Resultados*) en condiciones muy restrictivas y poco restrictivas, revela la presencia de una sola copia del gen en el genoma del hongo, y la ausencia de genes homólogos.

Un análisis Southern realizado sobre DNA de una serie de especies de *Trichoderma* (figura 24a de *Resultados*) en condiciones altamente restrictivas revela la existencia de fragmentos de DNA en el genoma de todos los hongos analizados muy homólogos al cDNA CHIT42. Entre estos hongos se distinguen dos grupos: uno, constituido por las especies *T. harzianum*, *T. viridens* y *T. (G.) virens*, que poseen actividad micoparasitaria, y otro, constituido por las especies no micoparásitas *T. longibrachiatum*, *T. reesei* y *T. koningii*. Los resultados obtenidos indican la alta conservación del gen *chit42* entre ellos, a pesar de que se ha propuesto que los dos grupos están bastante alejados filogenéticamente (Inbar y Chet, 1995).

Así pues, se han encontrado sendos genes homólogos a *chit42* en las especies de *Trichoderma* analizadas. Sin embargo, los datos que se extraen del análisis northern realizado con el RNA obtenido de micelios de las distintas especies inducidos por quitina (figura de *Resultados*), muestran que la expresión del gen es muy diferente, siendo muy alta en las especies *T. harzianum* y *viride*, media en *T. (G.) virens*, e indetectable en el resto. Teniendo en cuenta que la quitinasa que se expresa más abundantemente en cultivos de *T. harzianum* CECT2413 inducidos por quitina es la CHIT42, estos datos son coherentes con las medidas de actividad quitinasa que se habían obtenido previamente a partir de sobrenadantes de los cultivos correspondientes, así como de la presencia de proteínas que reaccionan con el anticuerpo anti-CHIT42 en los mismos (De la Cruz, 1994). En las dos primeras especies analizadas, *T. harzianum* y *T. viride*, la actividad quitinasa y la cantidad de proteína son bastante altas; en *G. (T.) virens* ambas son mucho menores, y en el resto no se detecta apenas proteína y la actividad quitinasa excretada es muy baja.

Recientemente, se ha realizado en nuestro laboratorio una serie de experimentos con los hongos antagonistas que se presentan en este trabajo (M. Rey, comunicación personal), que ponen de manifiesto que la capacidad micoparasitaria exhibida por cada especie no está correlacionada en absoluto con la capacidad antagonista del hongo, sino que esta última depende del dúo antagonista-víctima que se elija. Hay grandes variaciones entre las diversas parejas, pero todos los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* analizados (los citados anteriormente) son capaces de matar a un número variable de víctimas de entre las 10 utilizadas, y entre las cuales se encuentran especies fitopatógenas tan importantes como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* o *Alternaria alternata*. Estos datos son en apariencia contradictorios con una serie de trabajos en los que se propone una correlación entre las actividades enzimáticas de hidrolasas (quitinasas, glucanasas y proteasas) en la acción antagonista de estos hongos. Elad *et al.*, 1982, encuentran una correlación positiva entre las actividades quitinasa y glucanasa de diferentes estirpes de *T. harzianum* y su capacidad para controlar varios

hongos fitopatógenos. De hecho, la actividad quitinasa que presenta *Trichoderma* al ser enfrentado con diferentes hongos es muy diversa, y podría determinar la sensibilidad de éstos ante el micoparásito (Elad *et al.*, 1982; Ridout *et al.*, 1986). Di Pietro *et al.*, 1993, encuentran que la endoquitinasa de *G. virens* equivalente a CHIT42 es capaz de inhibir la germinación de *B. cinerea*, y de romper los ápices de sus hifas, siendo este efecto mucho más pronunciado a mucho menores concentraciones cuando a la endoquitinasa se le adiciona la acción del antibiótico gliotoxina. Lorito *et al.*, 1996, observan también este efecto sinérgico entre enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* y antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana celular, y proponen que la acción de estos compuestos se ve potenciada por las enzimas hidrolíticas puesto que éstas desorganizan las paredes celulares y, por lo tanto, facilitan el acceso a la membrana de los antibióticos. Como contrapartida, Howell, 1987, encuentra unos mutantes de *G. virens* que han perdido la capacidad micoparasitaria, pero que son capaces de controlar al fitopatógeno *R. solani* con igual eficacia que la cepa parental. Estos mutantes mantienen, en cambio, la producción de antibióticos característica, que sería la responsable del efecto antagonista.

Sin embargo, a tenor de los más recientes experimentos, la actividad hidrolítica estaría implicada más bien en la acción saprofítica consiguiente a la muerte de la víctima por el antagonista (ya sea por autólisis debida al estrés nutricional u otro tipo de estrés, o a la acción de antibióticos), posibilitando una rápida degradación de los polímeros de los hongos micoparasitados, y proporcionando al antagonista mayor eficacia en el aprovechamiento de los productos obtenidos para su crecimiento, desarrollo y expansión (Rey *et al.*, 1996, resultados no publicados). De hecho, Rey *et al.*, 1996, encuentran que las especies con más actividad hidrolítica son capaces de crear halos de lisis con mayor eficacia sobre paredes aisladas de diferentes hongos y, por lo tanto, aprovechar los nutrientes que contienen.

El otro gen aislado de *Trichoderma* que codifica una quitinasa, *chit33*, está ausente en las especies de *Trichoderma* consideradas no micoparásitas (M. Carmen Limón, comunicación personal). Este dato, unido al ya discutido de la diferente regulación que presenta este gen, sugiere que las dos quitinasas poseen funciones distintas.

## **2. PLANTAS TRANSGÉNICAS CHIT42 Y psCHIT42.**

Las construcciones CHIT42 y psCHIT42 han sido expresadas en tabaco, sin que ello produjera ninguna alteración del aspecto de las plantas, ni de sus órganos reproductivos. La presencia de quitinasa en plantas ha sido descrita en muchas ocasiones. En cuanto a su función endógena en la planta (ver apartado de la *Introducción*), se ha sugerido que estas enzimas participan en una serie de procesos fisiológicos durante el desarrollo del embrión (De Jong *et al.*, 1992; Kragh *et al.*, 1996). No obstante, en la mayoría de los estudios realizados, las quitinasas vegetales se encuentran asociadas a los mecanismos de defensa contra organismos fitopatógenos (revisado por Collinge *et al.*, 1993). La actividad quitinasa se incrementa en las plantas heridas o que han sido tratadas con moléculas vegetales o fúngicas capaces de inducir la respuesta global antimicrobiana (“*elicitors*”), y forma parte de la respuesta hipersensible al ataque de patógenos (Hedrick *et al.*, 1988; Kurosai *et al.*, 1990; Metraux y Boller, 1982).

## 2.1. Expresión de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas.

Las plantas CHIT42 y psCHIT42 expresan la quitinasa CHIT42 de *T. harzianum* de forma enzimáticamente activa. Sin embargo, la movilidad electroforética de la quitinasa expresada por las plantas CHIT42 es diferente a la de la proteína fúngica o a la expresada por las plantas psCHIT42. Una proteína puede sufrir modificaciones postranscripcionales por diversas causas, que pueden originar cambios en la movilidad electroforética (Bednarek y Raikhel, 1992). Entre ellas, la proteína CHIT42 expresada por plantas de tabaco puede presentar alteraciones en el patrón de glicosilación o fosforilación, o bien un defectuoso procesamiento proteolítico de los péptidos señal y de activación (ver la estructura de la proteína CHIT42 en el apartado de Resultados).

En nuestro caso, sin embargo, muchas de estas posibilidades han de desecharse. En primer lugar, si las glicosilasas y/o fosforilasas vegetales son capaces de reconocer y actuar sobre algunos de los sitios putativos de glicosilación o fosforilación presentes en la proteína CHIT42, que, por otra parte, no son funcionales en el hongo (De la Cruz *et al.*, 1992), tanto las plantas CHIT42 como las psCHIT42 deberían expresar una quitinasa de mayor peso molecular que la proteína aislada de *Trichoderma*. De hecho, las únicas secuencias diferentes en las ORFs introducidas en ambos tipos de plantas están *a priori* destinadas a ser eliminadas, al menos en el caso de las plantas psCHIT42, que carece del péptido de activación y posee un péptido señal de plantas con su correspondiente secuencia de procesamiento (Tornero *et al.*, 1993). Existe una secuencia de fosforilación en el péptido de activación del hongo, cuya presencia en la quitinasa expresada en las plantas CHIT42 implicaría, además, la existencia en dicha proteína del péptido de activación.

En segundo lugar, la localización extracelular de las proteínas expresadas por ambos tipos de plantas (ver apartado 2.3. de Resultados) refutan la hipótesis del procesamiento defectuoso del péptido señal en las plantas CHIT42. Además, el aumento de tamaño en este caso sería de unos 4kDa, y no de 2kDa, pues se añadiría al peso molecular de la proteína madura el de los péptidos señal y de activación.

Por lo tanto, el aumento de movilidad electroforética que presenta la proteína CHIT42 expresada por las plantas CHIT42 se debe a la presencia del péptido de activación, que tiene un peso molecular de aproximadamente 2kDa. Se ha propuesto para el procesamiento de este oligopéptido la acción de la endoproteasa Kex2 (ver antes, en el apartado 1.1. de Discusión, y en el 1.1. de Resultados). Si bien, como ya se ha discutido, la presencia de proteasas tipo Kex2 ha sido descrita en multitud de organismos, desde levaduras hasta mamíferos, sólo recientemente se han obtenido ciertas evidencias de actividad endoproteasa específica frente al enlace peptídico inmediatamente posterior a las secuencias dibásicas KR o PR. Yinai *et al.*, 1994, transforman plantas de tabaco con el cDNA KP6, que codifica una preprotoxina killer de *Ustilago maydis*. La toxina activa consta de dos subunidades, que son escindidas de la preprotoxina por un procesamiento proteolítico tipo Kex2 (Tao *et al.*, 1990). Las plantas transgénicas no sólo presentan actividad killer, sino que, además, excretan al apoplasto las dos subunidades correctamente procesadas.

No obstante, nuestros resultados contradicen los datos anteriores. Sólo la presencia del péptido de activación en la proteína expresada por las plantas CHIT42

explica el aumento de peso molecular observado tanto en los órganos aéreos de la planta adulta como en las raíces, órganos reproductivos y germinulas de las plantas transgénicas. El tratamiento con ácido salicílico, que induce la expresión de multitud de proteínas relacionadas con la respuesta hipersensible (revisado por Enyedi *et al.*, 1992), entre las cuales se encuentran algunas proteasas (Vera y Conejero, 1988) no es capaz, tampoco, de restablecer el tamaño previsto de la proteína CHIT42 correctamente procesada. Las plantas transformadas con la versión genómica del cDNA CHIT42 expresan también una proteína 2 kDa mayor que la quitinasa madura (Matteo Lorito, comunicación personal).

Por otra parte, la proteína expresada por las plantas CHIT42 es activa a pesar de la presencia del péptido de activación. Las actividades específicas (unidades/ $\mu$ g proteína CHIT42) de las proteínas expresadas por las plantas CHIT42 y psCHIT42 son, además, muy similares (ver apartado 2.2.7. de Resultados), al menos para el sustrato MeUmbQ. Se ha sugerido un papel regulador de la actividad quitinasa para este péptido, denominado de hecho “de activación”, de modo que la proteína no es activa hasta que el pequeño péptido es eliminado (ver apartado 1.1. de esta Discusión). En plantas, algunas proteínas PR son procesadas proteolíticamente tras la infección con patógenos, aunque se desconocen las consecuencias de la proteólisis en la actividad antifúngica de estas proteínas (Shinshi *et al.*, 1988; Rodrigo *et al.*, 1991, Lange *et al.*, 1996). No obstante, existe un caso parecido al que nos ocupa en el cual se ha comprobado que la glucanasa EXG1 de levaduras que también presenta un péptido “de activación” acabado en una secuencia KR presenta actividad glucanasa en mutantes *kex2* de levaduras (Francisco del Rey, comunicación personal).

Otra explicación de este fenómeno podría basarse en la especificidad de sustrato de las proteínas madura y sin madurar. En los ensayos realizados, el sustrato MeUmbQ es un oligómero de tres GlcNAc, muy diferente a la  $\alpha$ -quitina presente en las paredes fúngicas. Una versión de la quitinasa de *Streptomyces olivaceoviridens* que carece de la zona de unión a quitina hidroliza la  $\alpha$ -quitina con menos eficacia que la proteína completa, si bien otros sustratos, como son la quitina coloidal u oligómeros de quitina, son degradados de igual modo por ambas formas, completa e incompleta (Blaak y Schrempf, 1995). Podría suceder que la quitinasa expresada por las plantas CHIT42 careciera de actividad frente a la quitina natural, aunque el comportamiento frente al sustrato artificial MeUmbQ sea el mismo que el de la proteína madura.

## **2.2. Localización de la proteína CHIT42 en las plantas transgénicas.**

Las plantas transgénicas CHIT42 y psCHIT42 expresan una proteína extracelular, como lo demuestran los experimentos de extracción de proteínas extracelulares y de microscopía electrónica (apartados 2.3.2. y 2.3.4. de Resultados).

Si bien el apoplasto corresponde a menos del 5% del volumen total de los órganos vegetativos de las plantas (Grignon y Sentenac, 1991), es de gran importancia en algunos de sus procesos biológicos. El contenido de la matriz extracelular vegetal varía como respuesta a una gran cantidad de estímulos, bióticos y abióticos. Si se tiene en cuenta que las células vegetales son inmóviles, y que mantienen una continuidad citoplasmática en la planta, las modificaciones locales del apoplasto adquieren aún más relevancia (Knox, 1992). Durante las interacciones con patógenos, este compartimento juega un importante

papel puesto que en él se encuentran por primera vez el patógeno y la víctima, y tienen lugar los eventos de reconocimiento. Las respuestas rápidas frente al ataque, en forma de modificaciones locales (Bradley *et al.*, 1992), e iniciación de una transmisión de señales que culmina en la activación transcripcional de genes de defensa (Dixon y Lamb, 1990; Lamb *et al.*, 1989), tienen lugar en el apoplasto, que constituye de este modo una primera barrera defensiva frente al ataque.

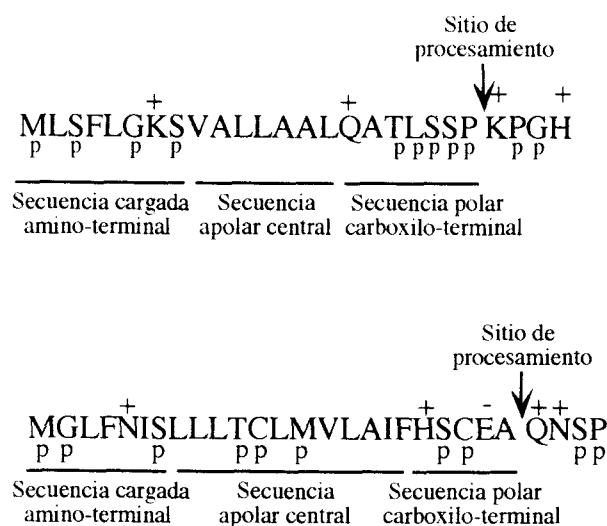
Las quitinasas de plantas se han localizado en el espacio apoplástico o bien en las vacuolas. No se ha encontrado, sin embargo, ninguna relación entre su localización y la actividad quitinasa o antifúngica que presentan, si bien se ha propuesto que las quitinasas extracelulares forman parte de una respuesta temprana. Así, las quitinasas apoplásticas actuarían directamente sobre el hongo invasor, impidiendo la elongación de los ápices de sus hifas, e indirectamente, liberando *elicitors* fúngicos que inducirían a su vez la batería de genes implicados en la reacción general de defensa de la planta (Collinge *et al.*, 1993). De hecho, se ha observado que el tratamiento con oligosacáridos de quitina induce la lignificación de hojas de zanahoria y trigo y la actividad quitinasa de plantas de melón (Barber *et al.*, 1989; Kuroshaki *et al.*, 1988; Roby *et al.*, 1987). En este modelo, las quitinasas vacuolares actuarían en un estadio más tardío de la infección, en el que el colapso celular, consecuencia de la invasión del patógeno o de la propia respuesta hipersensible de la planta (Collinge *et al.*, 1993), libera las quitinasas vacuolares al exterior, alcanzándose rápidamente en la zona atacada una transitoriamente alta concentración de quitinasas que, sinérgicamente con las glucanasas acumuladas en la vacuola, degradarían con gran eficacia las paredes nacientes del hongo invasor (Mauch y Staehlein, 1989).

La localización extracelular de la quitinasa expresada por las plantas CHIT42 indica que el péptido señal de la proteína fúngica es funcional en plantas. La estructura de los péptidos señal de todos los organismos, eucarióticos y procarióticos, está muy conservada (von Heijne, 1984). En el límite, se ha encontrado que péptidos al azar pueden funcionar como péptidos señal en levaduras (Kaiser *et al.*, 1987). Sin embargo, éste no es el caso más común, y el análisis de un gran número de péptidos señal de diversos organismos revela una serie de diferencias en las secuencias de los péptidos señal de cada grupo (von Heijne y Abrahmsen, 1989). Las diferencias también se han puesto de manifiesto al estudiar la eficacia de péptidos señal heterólogos. Los resultados de estos estudios son muy diversos, y a menudo contradictorios, pues se ha encontrado en algunos casos mayor eficacia en la secreción de proteínas heterólogas con un péptido señal homólogo, y en otros, que la secreción de una proteína heteróloga es más eficiente cuando ésta porta su propio péptido señal que cuando está dirigida por una secuencia señal homóloga (revisado en Lund y Dunsmuir, 1992).

En cualquier caso, y en relación con la secreción de proteínas en plantas (revisado por Chrispeels, 1991, y Bednarck y Raikhel, 1992), se ha comprobado que la presencia de un péptido señal es necesaria y suficiente para la entrada de la proteína que lo porta en la vía secretora. El péptido señal es reconocido por ciertas proteínas de la membrana de RE, y es eliminado cotraduccionalmente por una endopeptidasa específica, a la vez que el péptido naciente es traslocado al interior del RE, a través, posiblemente, de unas proteínas específicas. En este compartimento celular y en el aparato de Golgi, las proteínas pueden sufrir numerosas modificaciones, según los elementos que se encuentren en su secuencia. En primer lugar, y con la ayuda de unas proteínas específicas tipo chaperona que se han

encontrado en el RE, las proteínas adquieren su correcta estructura terciaria (revisado por Gething y Sambrook, 1992). Las diferentes glicosilasas que se encuentran en el RE y en el aparato de Golgi actúan sobre sitios específicos de reconocimiento (señalados en la figura 14 de Resultados para la proteína CHIT42), se forman los puentes disulfuro y los oligómeros pertenentes, y algunos aminoácidos pueden ser modificados (Pro en Hyp, por ejemplo). Las secuencias carboxilo-terminal KDEL o HDEL determinan la permanencia en el RE de las proteínas que lo portan. Del mismo modo, existen secuencias que dirigen las proteínas hacia la vacuola, localizadas en este caso en diversos lugares de la proteína, bien en el extremo amino-terminal de la proteína madura, bien en elementos amino- o carboxilo-terminales que se eliminan por proteólisis (revisado por Nakamura y Matsouka, 1993). Si en una proteína que contiene un péptido señal no existen secuencias de retención en el retículo endoplasmático o de localización vacuolar, ésta será excretada.

Si comparamos los péptidos señal de las proteínas que expresan las plantas CHIT42 y psCHIT42 (figura 54), se observa que ambos mantienen la estructura consenso (von Heijne *et al.*, 1984, ya discutido en el apartado 1.1. de esta Discusión), presentando el péptido señal de la proteína P1-p14 de tomate cierta polaridad en la región central, "apolar". Sin embargo, y como se ha comprobado en este trabajo, ambos son igualmente funcionales en las plantas.



**Figura 54. Comparación de los péptidos señal de las proteínas CHIT42 y psCHIT42.** Se señalan los aminoácidos con carga positiva (+), los que poseen carga negativa (-), y aquellos cuyo radical es polar (p). Las flechas señalan los respectivos sitios de procesamiento.

### 2.3. Expresión del mRNA CHIT42 en plantas transgénicas.

Los niveles de expresión de la proteína heteróloga, así como la actividad quitinasa que presentan las plantas CHIT42 son mucho menores (un orden de magnitud) que los de las plantas psCHIT42. Este fenómeno es aparentemente inexplicable, puesto que la expresión de ambas construcciones está sometida al control de la misma región promotora, la del CaMV35S, y, como se ha visto, la localización de la proteína es la misma en los dos tipos de plantas. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que estas diferencias se deben a variaciones en los niveles del mRNA CHIT42 que contienen las plantas transgénicas de los dos tipos, siendo los de las plantas CHIT42 mucho menores que los de las plantas psCHIT42.

Las plantas, organismos sésiles, tienen la capacidad de ajustar rápidamente la expresión génica frente al medio cambiante. La regulación de la estabilidad del RNA les



proporciona un potente mecanismo para conseguir esta versatilidad (Abler y Green, 1996).

La estabilidad de los mensajeros se debe a muy diversos factores. Existen RNAs sometidos a una especial regulación durante el desarrollo de la planta. Esta regulación está determinada, en muchos casos, por elementos que controlan la eficacia de traducción, así como la estabilidad de los mensajeros correspondientes. La embriogénesis y la germinación, la luz, algunas hormonas y el envejecimiento controlan la expresión de factores que reconocen elementos en *cis* de los transcritos regulados por el programa de desarrollo (revisado por Gallie, 1993 y por Abler y Green, 1996). Otros estreses, como el choque térmico, el tratamiento con *elicitors*, la hipoxia, heridas o el déficit de agua o nutrientes, tienen también efecto sobre la estabilidad de ciertos mensajeros.

Sin embargo, no sólo los elementos en *trans* inducidos por algunas de las condiciones anteriormente citadas son capaces de influir en la estabilidad de los mensajeros. Se ha descrito una serie de elementos que actúan en *cis* sobre la estabilidad de los transcritos. Puesto que las diferencias entre las plantas CHIT42 y psCHIT42 se mantienen en toda la planta, suponemos que se deben principalmente a estos últimos elementos, que se analizan a continuación.

La estructura 5' "cap" y la cola de poli-A protegen al RNA frente a la acción de ribonucleasas y posibilitan la traducción de los transcritos, siendo la dependencia de estos dos elementos mucho más acusada en los genes vegetales que en los animales (revisado por Gallie, 1993 y por Abler y Green, 1996). Mientras que el efecto del "cap" y el poli-A en la estabilidad de los transcritos es aditiva (Abler y Green, 1996), su efecto en la eficacia de traducción de los transcritos es sinérgica (revisado por Gallie, 1996). En numerosas ocasiones se ha encontrado una fuerte dependencia entre la eficacia de traducción y la estabilidad de los mensajeros. Es el caso de un inhibidor de la tripsina de soja y de la fitohemaglutinina de judía, cuyas mutaciones de terminación prematura no alteran la eficacia de traducción del mensajero correspondiente, pero sí la acumulación del mismo (Jofuku *et al.*, 1989; Voelker *et al.*, 1990). Se ha propuesto que este hecho se debe a la activación de RNAsas asociadas a los ribosomas, o bien que las zonas del RNA desprovistas de ribosomas presenten una mayor sensibilidad a RNAsas nucleares o citoplasmáticas (revisado por Green, 1993). El contexto del codón de iniciación juega un papel importante en este aspecto. En plantas, se ha encontrado que el contexto óptimo es UAAACAAUGGCU, del cual las posiciones -3 y, sobre todo, +4 (señaladas en negrita) son críticas (revisado por Gallie, 1993, y por Koziel *et al.*, 1996).

Se han identificado elementos en *cis* estabilizadores e inestabilizadores en los mRNA, que funcionarían, respectivamente, como secuencias diana para RNAsas y como sitios de unión para factores protectores de la degradación. La estructura de la zona 5' no codificante juega un cierto papel en la estabilidad del mensajero, siendo dichas regiones ricas en A+T en la mayoría de los genes nucleares vegetales estudiados (Koziel *et al.*, 1996). Zonas ricas en A+T de la zona 5' no codificante del gen de la  $\beta$ -faseolina son capaces de aumentar la expresión del gen GUS en plantas transgénicas de tabaco (Bustos *et al.*, 1989). La zona 5' no traducida del gen *Em* de trigo contiene unos elementos PuCAGCPy cuya repetición aumenta la expresión del gen GUS en plantas transgénicas (Marcotte *et al.*, 1989).

Sin embargo, las secuencias más determinantes de la inestabilidad de los mensajeros de plantas se han encontrado en la zona 3' no traducible de los genes. Deleciones en la zona 3' no codificante del gen *cryIA(b)* de *B. thuringiensis* aumentan la expresión de dicho gen en plantas transgénicas (Murray *et al.*, 1991). La introducción de repeticiones del elemento ATTTA en la zona 3' no codificante de genes informadores los dirigen hacia una rápida degradación de los transcritos correspondientes (Green, 1993; revisado por Abler y Green, 1996). Esta secuencia se han encontrado, en una sola copia o repetida varias veces, en la zona 3' no codificante de otros genes vegetales, y en varias ocasiones se ha demostrado que actúa como elemento de inestabilidad, determinando la degradación del mRNA por RNasas (Takahashi y Nagata, 1992).

Otras secuencias determinantes de inestabilidad de los mensajeros de plantas se han encontrado en las regiones 3' no codificantes de los genes *SAUR* ("Small Auxin Up RNA"). Estos RNAs se encuentran entre los más inestables de las plantas, y se ha observado que su secuencia 3' no codificante determina esta inestabilidad. En la secuencia 3' no codificante de estos genes se encuentra un elemento muy conservado, denominado DST (DownStream). La secuencia consenso de los elementos DST de los diversos genes *SAUR* consta de tres dominios, dos de los cuales están especialmente conservados: cATAGATta y A/CAA/TTtGTA. Se ha observado que al incluir dos elementos DST en la zona 3' no codificante de genes informadores, la estabilidad de los transcritos correspondientes en células de tabaco transformadas decae rápidamente (Newman *et al.*, 1993).

En la figura 55 se esquematizan los elementos estabilizadores y desestabilizadores de mRNA contenidos en las secuencias 5' y 3' no codificantes de las construcciones CHIT42 y psCHIT42. Si bien no se han encontrado secuencias canónicas ATTTA en el 3' no codificante, secuencias muy parecidas, repetidas 3-4 veces, están presentes en la construcción CHIT42 y no en la psCHIT42. Por otra parte, tampoco se encuentra la secuencia DST canónica, aunque los elementos segundo y tercero del mismo están presentes en la secuencia 3' no codificante de la construcción CHIT42.

Es posible que la presencia de las repeticiones ATTTA y los elementos distales de la secuencia DST en las plantas transgénicas CHIT42, unida al efecto de los elementos estabilizadores del RNA de la zona 5' no codificante de la construcción psCHIT42, procedente del cDNA vegetal pTE 28.1, sean responsables de las diferencias observadas en la acumulación del mensajero CHIT42 entre las plantas CHIT42 y las plantas psCHIT42.

(A)

pTE 28.1

5' GCACGAGATTTTCTCTCCACTAAACCTAAAGAAAATG\*GGG 3'  
M G

CHIT42

5' CGTTGCTGTCGAGCTTGAACAATCTACCAACATCACAAGCAATTCACCATGTTG 3'  
M L

Secuencia consenso de estabilización de mRNA en 5': PuCACGPy

Secuencia consenso de comienzo de proteínas: TAA ACA ATG GCT\*

Sitios ricos en A+T en el 5'

(B)

5' CTGAACTAGGCTGCCTGTTTTGAGGCGCCTTATGGACATTGAAGTCGTCGCGGGGAAATCGT  
L \*

CTTGGAGGAGCAGGGTCATGAAGTAAATATTGTTAAATACCTGTACATAGCCACATTAGC

ATATAGATGCATGAATAGTATCTGAGTTTATTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

Secuencia consenso de inestabilidad en el 3': ATTTA

Secuencia de corte de la enzima SspI: AAT↓ATT

Secuencia consenso del elemento DST: GGA N<sub>4</sub> cATAGATta N<sub>7,8</sub> A/CAA/TTtGTAc

**Figura 55. Análisis de las secuencias 5' y 3' no codificantes de las construcciones CHIT42 y psCHIT42. (A).** Elementos estabilizadores del mRNA en la zona 5' no codificante de las construcciones CHIT42 y psCHIT42. **(B).** Elementos desestabilizadores del mRNA en la zona 3' no codificante del cDNA CHIT42. La construcción CHIT42 porta toda la secuencia, mientras que en la construcción psCHIT42 la secuencia contenida entre la diana SspI y el final (poliA) está ausente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA.

Baker (1989) Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**: 34-38

Beffa RS, Neuhaus JM and Meins F Jr (1993). Physiological compensation in antisense transformants: specific induction of an "ersatz" glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase in plants infected with necrotizing viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8792-8796

Bernasconi P, Locher R, Pilet PE, Jollès J and Jollès P (1987). Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. *Biochem Biophys. Acta* **915**: 254-260

Bevan, M.W. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* , **12**: 8711-8721.

Blaiseau P.L. and Lafay J.F. (1992). Primary structure of a chitinase-encoding gene (*chil*) from the filamentous fungus *Aphanocladium album*: similarity to bacterial chitinases. *Gene* **120**: 243-248.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* , **72**: 248-254.

Brogliè KE, Gaynor JJ and Brogliè RM (1986). Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6820-6824.

Brogliè KE, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton C, Mauvais CJ and Brogliè R (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254**: 1194-1197.

Cabib, 1987 *Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology*, pp 59-101.

Cassab, G. I., and Varner, J. E. (1987). Immunocytochemical localization of extensin in developing soybean seed coat by immunogold silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell. Biol.*, **105**: 2581-2588.

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U and Vad K (1993). Plant chitinases. *Plant J.* **3**: 31-40.

Cook and Baker (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogen. American Phytopathological Society, St. Paul MN, 539.

Danhash N, Wagemakers CAM, van Kan JAL and de Wit PJGM (1993). Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Mol. Biol.* **22**: 1017-1029.

De la Cruz J., Hidalgo-Gallego A., Lora J.M., Benítez T., Pintor-Toro J.A., and Llobell A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* **206**:859-867.

De la Cruz J., Rey M., Lora J.M., Hidalgo-Gallego A., Dominguez F., Pintor-Toro J.A., Llobell A., Benitez T. (1993). Carbon source control on  $\beta$ -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol* **159**: 316-322.

De la Cruz, J. (1994). Purificación y caracterización de hidrolasas implicadas en el micoparasitismo de *Trichoderma harzianum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

De la Cruz, J. Pintor-Toro J.A., Benítez T. and Llobell A. (1995) Purification and characterization of an endo  $\beta$ (1,6)-glucanase from *Trichoderma harzianum* related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* **177**: 1864-1871.

De la Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T., Llobell, A and Romero, L.C. (1995) A novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.*, **177**: 6937-6945.

Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.*, **12**: 387-395.

Düring K (1993) Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants? *Plant Mol. Biol.* **23**: 209-214.

Elad Y., Chet I. and Henis Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **28**: 719-725.

Gabriel and Rolfe (1990) Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* **28**: 365-391.

Gallie B (1993). Posttranscriptional regulation of expression in plants. *Ann. Rev. Plant Phys. and Plant Mol. Biol.* **44**: 77-105.

García I., Lora J.M., De la Cruz J., Benítez T., Llobell A. and Pintor-Toro J.A. (1994). Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* **27**: 83-89.

Haran, S., Schickler, H. and Chet, I. (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol.* **142**: 2321-2331.

He, M., Wilde, A. and Kaderbhai, M. A. (1991). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucl. Ac. Res.*, **18**: 1660.

Hsiao, K. (1991). A fast a simple procedure for sequencing double stranded DNA with Sequenase. *Nucl. Ac. Res.*, **19**: 2787.

Iseli B, Boller T and Neuhaus JM (1993). The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol.* **103**: 221-226

Jach G., Görnhardt B., Mundy J., Logemann J., Pindsdorf E., Leah R., Schell J. and Maas C. (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**: 91-109.

Kinai H., Park C., Berry J., Koltin Y. and Bruenn J. (1995) Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *The Plant Cell* **7**: 677-688.

Kuranda, M. J. y Robbins, P. W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19758-19767.

Lai D.M.L., Hoj P.B. and Fincher G.B. (1993) Purification and characterization of (1,3,1,4)- $\beta$ -glucan endohydrolases from germinated wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Mol. Biol.* **22**: 847-859.

Lamb CJ, Ryals JA, Ward ER and Dixon RA (1992). Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens *Mol., Cell. Biol.* **7**: 335-341

Lorito M., Harman G., Hayes C.K., Broadway R.M., Tronsmo A., Woo S.L and Di Pietro A. (1993) Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* **83**: 302-307.

Lorito, M., Peterbauer, C.K., Sposato, P., Mach, R.L., Strauss, J. and Kubicek, C.P. (1996). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* gene in *Trichoderma harzianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

Meikle P.J., Hoogenraad N.J., Bonig I., Clarke A.E. and Stone B.A. (1994). A (1,3,1,4)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1,3,1,4)- $\beta$ -glucans. *Plant J.* **5**: 1-9.

Melchers LS, Apotheker-de-Groot M, van der Knaap JA, Ponstein AN, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJC, van den Elzen PJM and Linthost HJM (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinase displays antifungal activity. *Plant J.* **5**: 469-480.



Melchers LS, Sela-Buurlage MB, Vloemans S, Woloshuk CP Van Roekel JSC, Pen J, van den Elzen PJM and Cornelissen BJC (1993). Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **21**: 583-593.

Moffat AS (1992). Improving plant disease resistance. *Science* **257**: 482-483)

Murray M.G. and Thomson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* **8**: 4321-4325.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F. and Peterson, G. B. (1982). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* , **162**: 729-773.

Sivan A and Chet I (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 675-682

Tornero P., Conejero V. and Vera P. (1994). A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 47-53.

Towin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gelsto nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* , **76**: 4350-4354.

Tsang, S. S., Yin, X., Guzzo-Arkuran, C., Jones, V. S. and Davison, A. J. (1993). Loss of resolution in gel electrophoresis of RNA: A problem associated with the presence of formaldehyde gradients. *BioTechniques*, **14**: 380-381.

Vögeli-Lange R., Fründt C., Hart C.M., Beffa R., Nagy F. and Meins F. Jr (1994). Evidence for a role of  $\beta$ -1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant J.* **5**: 273-278

von Heijne G. (1983) Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**: 17-21.

Wasdworth, G. H., Redinbaugh, M. H. and Scandalios, J. G. (1988). A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal. Biochem.*, **172**: 279-283.

Watanabe T., Kobori K., Miyashita K., Fujii T., Sakai H., Uchida M. and Tanaka H. (1993). Identification of glutamic 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 18567-18572.

Wolf (1992) Structure of the genes encoding *Hordeum vulgare* (1,3, 1,4)- $\beta$ -glucanase isoenzymes I and II and functional analysis of their promoter in barley aleurone protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 33-42.

Young, R.A. and Davis, R.W. (1983). Yeast RNAPolimerase II genes: Isolation with antibody probes. *Science* , **222**: 778-789.

Irene García Fernández

Caracterización del gen de la quitinasa CHIT42  
del hongo autógamo *Trichodesma harzianum* y  
análisis de su expresión en plantas de tabaco

UNANIMIDAD

APTO CUM LAUDE BOR

mca

abncp

92

B. Leber

El Vocal,  
El Doctorado,  
Vencido



500996059

FBI E TD / 374

500996059