

Tesis de Posgrado

Aspectos bioquímicos y moleculares de la interacción sclerotinia sclerotiorum-Daucus Carota

Bertinetti, Cristina M.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bertinetti, Cristina M.. (1996). Aspectos bioquímicos y moleculares de la interacción sclerotinia sclerotiorum-Daucus Carota. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2894_Bertinetti.pdf

Cita tipo Chicago:

Bertinetti, Cristina M.. "Aspectos bioquímicos y moleculares de la interacción sclerotinia sclerotiorum-Daucus Carota". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2894_Bertinetti.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES
DE LA INTERACCIÓN
*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM-DAUCUS CAROTA***

CRISTINA M. BERTINETTI

DIRECTOR: RODOLFO A. UGALDE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS, FUNDACION CAMPOMAR

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

Buffer: solución tampón, amortiguadora o reguladora

cDNA: copia de DNA a partir de RNA

Con A: concanavalina A

DEAE: dietilaminoetil

DNA: ácido desoxiribonucleico

DNAsa: desoxiribonucleasa

DO: densidad óptica

EDTA: etilen diamino tetraacetato

Fig: figura

FPLC: fast protein liquid chromatography

HPLC: high performance liquid chromatography

Kb: kilobase

pb: pares de bases

PCR: Polimerase Chain Reaction: reacción en cadena de la polimerasa

PM: peso molecular

Primer: oligonucleótido utilizado para comenzar la síntesis de DNA

RNA: ácido ribonucleico

RNAsa: ribonucleasa

RT-PCR: reacción de transcripción reversa seguida de PCR.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

TLC: cromatografía en capa delgada

INDICE

RESUMEN	1
----------------------	---

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	4
Estrategias de virulencia de hongos fitopatógenos	5
Adherencia, invasión y colonización de tejidos vegetales	5
Estrategias de resistencia de las plantas	6
Mecanismos constitutivos de resistencia	6
Mecanismos inducibles de resistencia	7
Reconocimiento del patógeno: elicitors microbianos	8
Transducción de señales	10
Síntesis de moléculas que participan en las reacciones de defensa de las plantas	12
Modificación de las paredes celulares	12
Enzimas líticas y proteínas relacionadas a la patogénesis	13
Síntesis de fitoalexinas	13
Respuesta hipersensitiva	15
Resistencia sistémica en plantas	17
Patrones genéticos de las interacciones huésped-parásito	18
Interacción <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -Huéspedes susceptibles	21

CAPÍTULO 2

RESULTADOS	24
ANTECEDENTES	24
Efecto del agregado del extracto de pared de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sobre cultivos de zanahoria	25
Variaciones de la actividad de la PAL durante el ciclo de crecimiento del cultivo en suspensión de zanahoria	27
Actividad de la PAL en función del tiempo de incubación con el EEC	28
Actividad de la PAL en función de la concentración del extracto elicitor crudo de pared	29
Naturaleza química del elicitor de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	31
Tratamiento del extracto crudo con proteasas y glicosidasas	31

Fraccionamiento por tamíz molecular	33
Fraccionamiento por intercambio iónico.....	35
Fraccionamiento por columna de Concanavalina A-Sepharosa	37
Marcación <i>in vivo</i> de los polisacáridos de pared de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	38
Columna de superosa 6 HR.....	41
Respuesta de los cultivos de zanahoria a incubaciones sucesivas con el EEC de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	43
Degradación del EEC por células de zanahoria	44
Inducción de la síntesis de compuestos fenólicos en cultivos de zanahoria incubados con extracto crudo de pared de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	47
DISCUSIÓN	50

CAPÍTULO 3

RESULTADOS	55
ANTECEDENTES	55
Análisis de la expresión diferencial de genes en células de zanahoria incubadas con EEC proveniente de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56
Aislamiento del RNA	56
Síntesis del cDNA y reacción de differential display	57
Clonado y secuenciación de los fragmentos amplificados.....	61
Inducción de la expresión del mRNA.....	64
RT-PCR.....	64
Northern blot.....	66
Clonado y secuenciación del cDNA.....	67
Clonado y secuenciación de un clon genómico	72
DISCUSIÓN	77
MATERIALES Y MÉTODOS	82
MATERIAL BIOLÓGICO	82
Cepa de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	82
Cultivo vegetal.....	82
Cepas bacterianas y plásmidos.....	83
MÉTODOS BIOQUÍMICOS	83
Obtención del extracto crudo de pared de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	83
Determinación de la actividad de la fenilalanil amonio-liasa.....	83

Dosaje de proteínas y carbohidratos.....	84
Tratamientos químicos.....	84
Tratamientos enzimáticos.....	84
Columna de tamíz molecular.....	85
Columna de intercambio iónico.....	85
Columna de Concanavalina A-Sepharosa.....	85
Análisis de los compuestos fenólicos.....	85
Cromatografías y electroforesis.....	86
Electroforesis en papel.....	86
FPLC.....	86
HPLC.....	87
Marcación de proteínas con [³⁵ S]-Metionina.....	87
MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	87
Extracción de DNA.....	87
Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	87
Reacción de differential display.....	88
Clonado y secuenciación de fragmentos de DNA.....	88
Clonado y secuencia completa de cDNA de <i>iEP4</i>	89
Electroforesis en geles de agarosa.....	89
Transferencia de RNA a membranas de nitrocelulosa (Northern blot) e hibridización.....	89
Reacciones de PCR.....	90
BIBLIOGRAFÍA.....	91

RESUMEN

Las plantas están expuestas a microorganismos en todos los estadios de su ciclo de vida. Si bien cada especie vegetal solo es susceptible a un número reducido de ellos, en condiciones fisiológicas adecuadas, las infecciones pueden ejercer sobre los sistemas graves daños y pérdidas devastadoras de las cosechas.

Para prevenir y controlar las infecciones, las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia basados en la capacidad para mantener o crear un ambiente desfavorable para el crecimiento y la acción de microorganismos fitopatógenos. Los mecanismos básicos de la resistencia involucran la existencia de barreras físicas y químicas preformadas que impiden el ingreso del agente infeccioso al interior del huésped, así como también mecanismos que implican respuestas inducibles, que llevan a la inhibición de la invasión y a la eliminación de los patógenos dentro de la planta.

Los eventos que llevan a la inducción de las respuestas de defensa incluyen la percepción de una señal por parte de la planta, la transducción intracelular de la señal recibida y la síntesis de moléculas de defensa, como fitoalexinas, quitinasas, glucanasas, proteínas relacionadas a la patogénesis y moléculas que intervienen en la modificación estructural de las paredes celulares (Chasan, 1994; Mahé *et al.*, 1993; Scheel *et al.*, 1991).

Los compuestos provenientes de las paredes de los microorganismos que tienen la propiedad de inducir alguna de estas respuestas en las plantas reciben el nombre de *elicitor* (Dixon *et al.*, 1994). El aislamiento y la caracterización de esta clase de moléculas y la búsqueda sistemática de genes que se induzcan o repriman en respuesta a ellas, permitirá en el futuro comprender los mecanismos moleculares que gobiernan la compleja interacción entre las plantas y los microorganismos.

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es el agente causal de diversas enfermedades en plantas de interés agronómico. Hasta el presente no se dispone de tratamientos químicos efectivos que las prevengan, así como tampoco se han encontrado variedades que sean totalmente resistentes a la infección entre las numerosas especies vegetales que forman parte del rango de huéspedes de este hongo extremadamente virulento.

Con respecto a los mecanismos de defensa de los distintos huéspedes frente a *S. sclerotiorum*, es muy escasa la información disponible (Sutton y Deverall, 1984; Bazzalo *et al.*, 1985; Mouly *et al.*, 1992). La mayor parte de los estudios llevados a cabo en relación a la interacción entre *S. sclerotiorum* y plantas susceptibles se han orientado al análisis de los mecanismos de virulencia del hongo. Se ha propuesto que las numerosas enzimas hidrolíticas que produce tendrían un rol

importante en el proceso de invasión de los tejidos vegetales y que la toxina que libera —ácido oxálico— se acumularía en el follaje, siendo la responsable de la marchitez foliar (Hancock, 1966; Hancock 1967; Bauer, 1977; Noyes y Hancock, 1980; Marciano *et al.*, 1982; Riou *et al.*, 1991; Favaron *et al.*, 1992).

En el presente trabajo se emplearon cultivos en suspensión de zanahoria como modelo experimental para analizar los mecanismos moleculares de la interacción entre las plantas y *S. sclerotiorum*. Cuando los cultivos fueron incubados con extractos de pared fúngica se observó la inducción de la síntesis de compuestos fenólicos y cambios en el patrón de proteínas solubles, indicando que el extracto de pared inducía importantes alteraciones en el metabolismo de las células de zanahoria. La inducción de la actividad de la fenilalanil amonio-liasa (PAL), considerada como marcador de respuestas de defensa de las plantas frente a los microorganismos fitopatógenos, fue utilizada como test biológico para seguir el aislamiento de fracciones de pared de *S. sclerotiorum* con actividad *elicitor* para las células de zanahoria.

Para la obtención de moléculas presentes en la superficie de la pared fúngica se utilizó un método originalmente empleado para aislar antígenos de superficie de levaduras (Raschke y Ballou, 1972). Este extracto de pared fue fraccionado en base a su tamaño (Bio-Gel A 0.5 M) y su afinidad por una columna de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex) y por una columna de Concanavalina A-Sepharosa. Como resultado de estos pasos de purificación se obtuvieron dos *elicitors*, un glucano y un manano, encontrándose cantidades equivalentes de ambos en la preparación de pared fúngica.

Por otra parte, con el propósito de identificar genes de zanahoria cuya expresión se induce en respuesta al *elicitor* fúngico se utilizó el método de «differential display» (Liang y Pardee, 1992). El análisis de la expresión diferencial de genes entre cultivos inducidos con el *elicitor* y cultivos controles no inducidos condujo al aislamiento y clonado de tres fragmentos que representarían probables mRNAs cuya síntesis es inducida por el *elicitor* de *S. sclerotiorum*.

A partir de uno de los fragmentos se obtuvo la secuencia completa del cDNA. La proteína deducida mostró una identidad de casi el 100% con una glicoproteína denominada EP4a, aislada a partir de sobrenadantes de cultivos de zanahoria por Van Engelen y colaboradores (1995) y un 55% de identidad con el producto deducido del gen ENOD 8 de alfalfa (Dickstein *et al.*, 1993). Otro de los fragmentos clonados (pCB19) mostró un 73% de identidad y un 82% de homología con el fragmento carboxi terminal de la β -D-glucano exohidrolasa de *Hordeum vulgare* (Hrmova *et al.*, 1996). Dado el grado de identidad encontrado, es altamente probable que el fragmento contenido en el pCB19 corresponda a una β -glucanasa de zanahoria. Considerando además que las células de zanahoria mostraron degradar activamente los polisacáridos presentes en el

extracto de pared de *S. sclerotiorum*, así como también a un β -glucano de características similares al glucano descrito por Jones en 1970 como componente de la pared de *S. sclerotiorum*, se podría especular que, a semejanza de lo descrito en otros sistemas, las células de zanahoria degradarían estos polisacáridos de gran tamaño a moléculas mas pequeñas, quienes serían en última instancia reconocidas por las células, desencadenando la cascada de eventos relacionados a la defensa ante las infecciones.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis han sido publicados en:

"Studies on the Response of Carrot Cells to a *Sclerotinia sclerotiorum* Elicitor: Induction of the Expression of an Extracellular Glycoprotein mRNA"

Cristina Bertinetti and Rodolfo Ugalde (1996) Mol. Plant-Microbe Interact. 9: 658-663.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Desde los comienzos de la práctica de la agricultura extensiva, uno de los objetivos perseguidos por el hombre ha sido la obtención de variedades vegetales que muestren altos rendimientos y resistencia a distintas condiciones de stress biótico y abiótico. La resistencia al daño producido por agentes infecciosos es un carácter genético de alto valor adaptativo que confiere, al genotipo que lo posee, una mayor aptitud biológica. Es por esto que el conocimiento de los mecanismos de resistencia a enfermedades de las plantas es fundamental cuando se trata de su modificación y mejoramiento.

Los vegetales están expuestos a microorganismos durante todo su ciclo de vida; a pesar de que el espectro de microorganismos fitopatógenos es muy amplio e incluye virus, micoplasmas, bacterias, hongos, nematodos e insectos, la susceptibilidad de las plantas a las infecciones es una condición excepcional (Gabriel y Rolfe, 1990). Un microorganismo potencialmente patógeno es generalmente capaz de parasitar y crecer sobre una única familia o género vegetal; aun bajo condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad las plantas que no están comprendidas en su rango de huéspedes son resistentes a la infección. Esta resistencia es denominada **resistencia general, resistencia básica** o “**non-host resistance**” (Hadwiger y Culley, 1993), para diferenciarla de la resistencia específica, término con que se designa a la resistencia a la infección que pueden manifestar algunas plantas comprendidas dentro del rango de huéspedes de un microorganismo patógeno particular.

Así como las plantas poseen componentes estructurales y químicos que intervienen en los procesos de defensa, los microorganismos patógenos generalmente expresan mecanismos de virulencia que les permiten aumentar su capacidad de colonizar y dañar a los tejidos vegetales. Por tanto, al analizar las interacciones entre las plantas y sus potenciales patógenos es necesario tomar en consideración que la resistencia de una planta a la infección y la capacidad infectiva (virulencia) de un microorganismo son propiedades complementarias, de modo que el resultado final de la interacción —producción o no de enfermedad— estará determinado por la combinación de los genotipos del huésped y del parásito (Keen, 1992).

Estrategias de virulencia de hongos fitopatógenos

La colonización de los tejidos vegetales depende de la capacidad del patógeno de superar los mecanismos de defensa que las plantas han adquirido a lo largo de su evolución. Para ello, los microorganismos fitopatógenos cuentan con un vasto conjunto de compuestos que inducen o reprimen procesos moleculares involucrados en la resistencia de las plantas hospedadoras.

Adherencia, invasión y colonización de tejidos vegetales

La relación entre una planta y un microorganismo patógeno involucra un vasto y continuo intercambio de señales que comienza cuando el patógeno toma contacto con la superficie de la planta. En el caso de los hongos esto ocurre cuando el micelio que comienza a desarrollarse en las cercanías de una planta potencialmente hospedadora se pone en contacto con las raíces o la base de los tallos, o cuando una espora se asienta sobre el tejido aéreo de la planta. La secuencia de eventos que prosiguen dependerá de las propiedades y capacidades de ambos organismos involucrados.

En condiciones fisiológicas y ambientales adecuadas, las esporas germinan y desarrollan tubos germinales. Sin embargo, dado que la reserva de nutrientes que poseen no es suficiente para permitir el crecimiento miceliar, los hongos han desarrollado diversos mecanismos que les facilitan los procesos de invasión y de toma de nutrientes. Así, algunos hongos fitopatógenos poseen estructuras especializadas para la infección, denominadas **apresorios**. Estos son engrosamientos del extremo del tubo germinal cuya función es la de adherirse fuertemente a la superficie sobre la que se ha asentado la espora, a partir de los cuales emerge el cordón de infección que invade los tejidos de la planta. Kolattukudy y col. (1995) demostraron recientemente que tanto la germinación como la formación de apresorios a partir de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* se inducen selectivamente por ceras de la superficie de su huésped, la palta. Por otra parte, en algunos casos la germinación de las esporas coincide con el estadio de maduración de los frutos, momento en el cual los hongos causan graves daños en las plantas huéspedes. En este sentido, los citados autores observaron que la señal de la planta que usarían los hongos para inducir la germinación y la formación de apresorios en *C. gloeosporioides* y *C. musae* (patógeno de banana) es el etileno, la hormona de maduración de las frutas (Flaishman y Kolattukudy, 1994).

Algunas especies penetran a través de los estomas o de heridas presentes en la superficie de las plantas, las que pueden provenir de daños mecánicos causados por condiciones climáticas

adversas, de daños debidos a los métodos de cultivo y/o cosecha utilizados, o de daños provocados por la acción de la actividad de animales o insectos. Otras, son capaces de sintetizar compuestos que cooperan en el proceso de penetración en los tejidos y en la expansión de la infección. Se han descrito hongos fitopatógenos que pueden penetrar directamente a través de la cutícula. Dado que esta capa externa de las plantas es habitualmente una efectiva barrera natural de protección, la capacidad de producir cutinasa —enzima que degrada la cutina presente en la cutícula— se traduce, para algunos hongos, en una importante ventaja adaptativa. Dickman y col. (1989) p.ej., demostraron que la introducción del gen de la cutinasa de *Fusarium solani pisi* en *Mycosphaerella spp.* convierte a este patógeno de la papaya —a la cual solamente es capaz de infectar invadiendo los tejidos a través de heridas en la cutícula— en un microorganismo con la habilidad de penetrar el fruto intacto.

Otras enzimas que contribuyen en la penetración e invasión de los tejidos son las hemicelulasas, pectinliasas, poligalacturonidasas, pectinasas, xilanasas, glucanasas, galactanasas y celulasas. Si bien la habilidad de producir enzimas con capacidad de degradar las paredes celulares de las plantas en general se correlaciona con la virulencia, aún no se ha establecido hasta que grado la participación de cada una de ellas es fundamental para el desarrollo de la enfermedad.

Otro importante factor de virulencia es la producción de toxinas, dado que éstas alteran los procesos fisiológicos de las plantas. Los hongos producen una gran variedad de compuestos tóxicos que dan como resultado síntomas como marchitamiento, clorosis y necrosis. Entre ellos se incluyen polipéptidos, glicoproteínas, derivados de aminoácidos, terpenoides, esteroides y quinonas (Isaac, 1992).

Estrategias de resistencia de las plantas

Bajo la expresión «resistencia» se hace referencia a la capacidad de una planta de prevenir o restringir el crecimiento y multiplicación de un microorganismo patógeno.

Las plantas poseen distintos mecanismos de defensa que comprenden barreras fisiológicas, físicas y químicas, tanto constitutivas como inducibles.

Mecanismos constitutivos de resistencia

La edad, el estado fisiológico y las condiciones climáticas preponderantes influyen en el grado de susceptibilidad de las plantas a la infección. Algunas características estructurales, tales como la

presencia de pelos, la forma de las hojas, la presencia, número y localización de estomas y lenticelas, están relacionadas con una mayor o menor facilidad en la penetración.

La cutícula, al ser una superficie hidrofóbica, evita la acumulación de agua creando condiciones no apropiadas para la adherencia y la germinación de esporas fúngicas. Asimismo, la abundancia y distribución de elementos lignificados y suberificados, el grado de lignificación y suberificación de éstos, y la proporción de pectatos de calcio insolubles en la laminilla media y la pared celular, actúan restringiendo la colonización de los tejidos vegetales por los microorganismos.

La resistencia a la invasión puede también deberse a que algunas sustancias, normalmente presentes en las plantas, resultan tóxicas para potenciales patógenos. Así, p.ej., se observó que variedades de cebolla resistentes a la infección con *Colletotrichum circinans*, acumulan catecol sobre la superficie de las hojas. Este exudado fungitóxico inhibe la germinación de las esporas del hongo (Isaac, 1992).

Mecanismos inducibles de resistencia

Frente a la presencia de potenciales patógenos, se desencadenan en las plantas una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos tendientes a limitar su penetración y desarrollo en los tejidos. Los eventos que llevan a la inducción de las respuestas de defensa incluyen el reconocimiento de una señal por parte de la planta, la transducción intracelular de la señal recibida y la síntesis de moléculas de defensa, como fitoalexinas, enzimas líticas, proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) y moléculas que intervienen en la modificación estructural de las paredes celulares (Scheel *et al.* 1991; Mahé *et al.* 1993; Chasan, 1994). La restricción del crecimiento del patógeno, en general, va acompañada por el desarrollo de pequeñas lesiones locales que resultan de la necrosis de las células que rodean el sitio de penetración del patógeno, fenómeno denominado *respuesta hipersensitiva* (HR).

Todas estas respuestas involucran la activación de la transcripción de los correspondientes genes (Medhy y Lamb, 1987; Haberer *et al.*, 1989; Dixon y Harrison, 1990). Distintas evidencias indican que las plantas, sean éstas resistentes o susceptibles, responden al ataque por patógenos induciendo una estrategia de resistencia coordinada, que conduce a la acumulación de los productos de los genes de defensa; sin embargo, el nivel de las respuestas es inferior en las plantas susceptibles y, además, aparece en ellas más tardíamente (Isaac, 1992).

Reconocimiento del patógeno: *elicitors* microbianos

Los esfuerzos realizados para dilucidar el mecanismo que conduce a la inducción de cambios estructurales y/o bioquímicos asociados con la expresión de resistencia en las plantas han permitido la caracterización de moléculas denominadas **elicitors** (Dixon *et al.*, 1994). El término hace referencia a compuestos que, una vez en contacto con las células vegetales, tienen la propiedad de estimular alguna respuesta de defensa en éstas. Estas moléculas pueden provenir del patógeno (*elicitors* exógenos) o de la planta hospedadora (*elicitors* endógenos).

El agregado de un *elicitor* sobre cultivos celulares de vegetales actúa como una señal que activa la transcripción de los genes de defensa, p.ej., los que codifican para quitinasas, glucanasas y enzimas de la vía de fenilpropanoides, estas últimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas y lignina —p.ej., Fenilalanil amonio-liasa (PAL), Chalcona sintetasa (CHS) y Chalcona isomerasa (CHI)— (Cramer *et al.* 1984). La fig. 1 muestra en forma muy simplificada un modelo de interacción de los *elicitors* con las células vegetales.

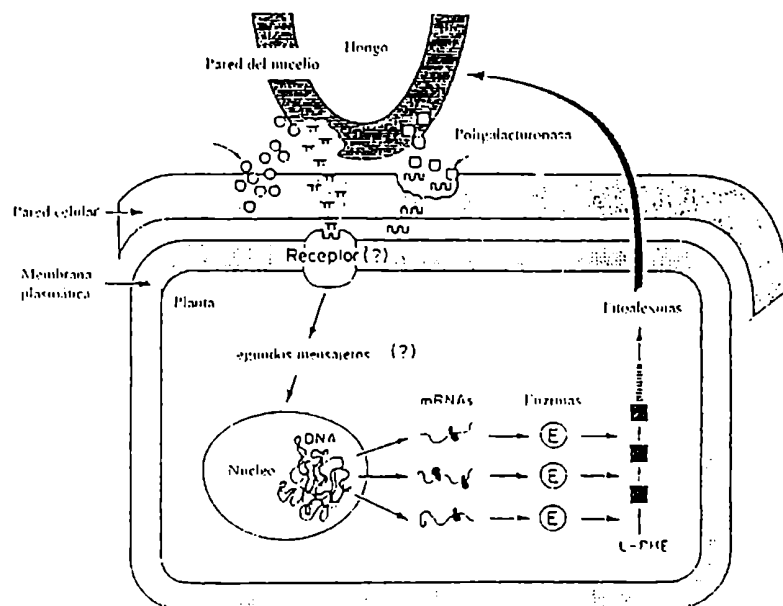


Fig. 1: Modelo de la interacción de los *elicitors* fúngicos con las células vegetales.

El primer *elicitor* aislado fue un hepta-b-glucósido, obtenido a partir de las paredes celulares del hongo *Phytophthora megasperma* f. sp. *sojae* en 1976 por Albersheim y colaboradores (Ayers *et al.*, 1976a y 1976b). La lista de *elicitors* fúngicos identificados hasta el presente incluye numerosos oligosacáridos provenientes de paredes celulares (Côté y Hahn, 1994), tales como oligómeros de quitina y quitosanos, glicopéptidos ricos en manosa (Fig. 2), glicoproteínas, péptidos (De Wit y Spikman, 1982) y fosfolípidos (Creamer y Bostock, 1986). Moléculas más pequeñas tales como el ácido araquidónico (Bloch *et al.* 1984), el ácido jasmónico (Creelman *et al.* 1992) y el ácido salicílico (Raskin, 1992), también actúan como *elicitors* al ser agregados a cultivos celulares vegetales.

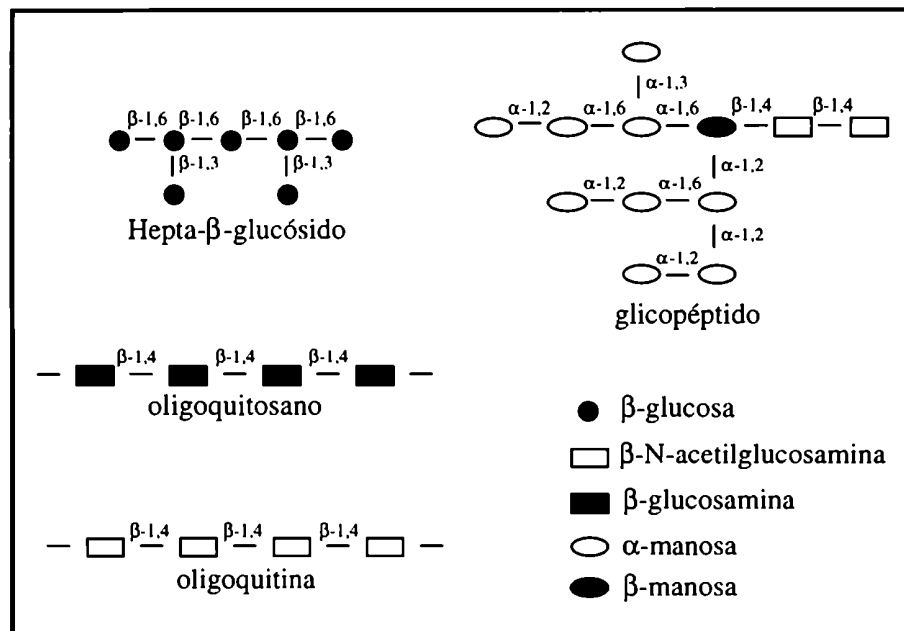


Fig. 2: Estructura de los principales *elicitors* fúngicos caracterizados.

Los oligogalacturónicos con un grado de polimerización de 8 a 15 residuos, provenientes de las pectinas presentes en las paredes celulares de las plantas, actúan como *elicitors* endógenos liberados por la acción de las endopoligalacturonasas de algunos patógenos. En estos casos, las proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIPs) son fundamentales en la activación de las

defensas del huésped. Esto es así debido a que las endopoligalacturonasas fúngicas continúan degradando rápidamente los fragmentos pécticos liberados, convirtiéndolos en moléculas más pequeñas que no poseen actividad biológica. En presencia de las proteínas PGIPs esta degradación se encuentra retardada, permitiéndole a la planta convertir un factor de virulencia del patógeno —la producción de una enzima que degrada la pared vegetal facilitando el proceso de invasión— en una señal que permite la activación de genes de defensa (Cervone *et al.*, 1990).

Se puede clasificar a los *elicitors* en **generales** y **específicos de raza**. Los primeros representan a la mayoría de los descriptos, frecuentemente son componentes estructurales de los microorganismos y estimulan una respuesta de defensa en todos los genotipos de una especie vegetal hospedadora; los segundos, *elicitors* específicos de raza, son producidos sólo por algunos biotipos del patógeno y se caracterizan por inducir una respuesta de defensa únicamente en aquellas variedades de plantas hospedadoras que poseen un receptor específico para su reconocimiento (Lindsay *et al.*, 1993).

El primer evento en la inducción de las respuestas de defensa mediadas por «*elicitors*» involucra un reconocimiento de éste por parte de las plantas. La especificidad de especie o cultivar mostrada por algunos *elicitors* y su capacidad de inducir varias respuestas de defensa de las plantas a concentraciones nanomolares son características que sugieren fuertemente la participación de receptores en el proceso de reconocimiento del *elictor* (Nurnberger *et al.*, 1994).

Si bien aún no se los ha caracterizado molecularmente, por medio de estudios de «binding» se han acumulado evidencias bioquímicas que refuerzan la idea de la existencia de receptores. Tanto en membranas plasmáticas de células de perejil (Nurnberger *et al.*, 1994), tomate (Basse *et al.*, 1993), arroz (Shibuya *et al.*, 1993) y soja (Cosio *et al.*, 1990), se han encontrado sitios de «binding» con alta afinidad por *elicitors*.

Transducción de señales

Las primeras reacciones observadas en un cultivo de células vegetales incubado con un *elictor* son, por un lado, cambios en la actividad de los canales iónicos de la membrana plasmática, y por otro, la formación de intermediarios reactivos de oxígeno, tales como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

En perejil, los receptores de un *elictor* proveniente de *Phytophthora megasperma* se saturan a los 3 minutos del agregado del *elictor* al cultivo celular. Inmediatamente después, entre los 2 y 5

minutos, se comienza a detectar un influjo de calcio (Ca^{2+}) y protones (H^+) y un eflujo de potasio (K^+) y cloro (Cl^-) a través de la membrana plasmática, que alcanza un máximo entre los 20 y 30 minutos (Hahlbrock *et al.*, 1995). En particular, el Ca^{2+} es de fundamental importancia en tanto que la expresión de algunas reacciones de defensa son estrictamente dependientes del influjo de este ión. Tanto en perejil como en soja se observó que la omisión de Ca^{2+} en el medio de cultivo bloquea la activación de genes de defensa y la síntesis de fitoalexinas (Dietrich *et al.*, 1990, Lindsay *et al.*, 1993); además, el agregado de ionóforos de Ca^{2+} en los cultivos de soja induce la síntesis de fitoalexinas, mientras que el agregado de inhibidores de canales de Ca^{2+} inhibe significativamente el influjo de este ión y la producción de fitoalexinas (Nurnberger *et al.*, 1994). Por lo demás, el Ca^{2+} activa la fosforilación de proteínas que podrían estar involucradas directa o indirectamente en la regulación y la expresión de genes (Dietrich *et al.*, 1990). Estas respuestas preceden claramente a la activación de los genes relacionados a la defensa, cuyos transcritos comienzan a detectarse a partir de las 2 horas (Cramer *et al.*, 1984; Dangl *et al.*, 1987; Ellis *et al.*, 1989); en consecuencia, se ha propuesto que tanto la activación transciente de los canales iónicos de la membrana plasmática como la fosforilación de proteínas serían componentes tempranos del sistema de transducción de señales (Fig. 3).

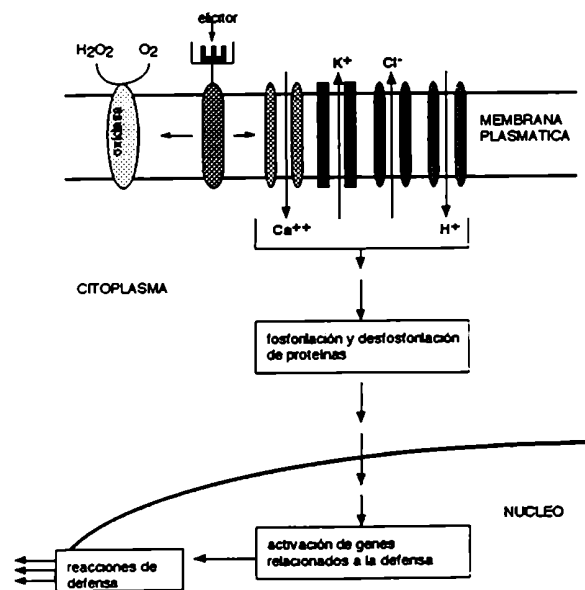


Fig. 3: Modelo hipotético de transducción de señales en perejil.

Inmediatamente después del inicio del intercambio de iones se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya concentración aumenta en el orden de 40-80 veces en el medio de cultivo, retornando a niveles basales a los 30-50 minutos post-infección. El H_2O_2 puede actuar directa o indirectamente sobre el patógeno. Directamente, como un agente antimicrobiano; indirectamente, como sustrato de la síntesis de precursores de ácido jasmónico mediada por lipooxigenasas, o mediando el cross-linking de HGRPs. Por otra parte, Levine y col. (1994) demostraron que en Soja el H_2O_2 actuaría como la señal que dispara la respuesta hipersensitiva de las células invadidas.

Otros compuestos sintetizados por las plantas —p.ej., etileno, ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y metil jasmonato— han sido implicados en la señalización a larga distancia, que es la base de la resistencia sistémica adquirida (SAR). Esta respuesta será considerada mas adelante.

Síntesis de moléculas que participan en las reacciones de defensa de las plantas

Modificación de las paredes celulares

Las paredes celulares de las plantas están compuestas por celulosa, hemicelulosa, pectina y proteínas estructurales. De estas últimas se han descrito tres clases principales: glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), proteínas ricas en prolina (PRPs) y proteínas ricas en glicina (GRPs).

En respuesta a una infección la composición de las paredes celulares se altera. En primer lugar, se produce un cross-linking oxidativo mediado por H_2O_2 de las proteínas preexistentes, que precede a la activación de respuestas de defensa dependientes de la transcripción de genes. En la formación de estas uniones intermoleculares intervienen peroxidasas, cuyos sustratos son las cadenas laterales de las tirosinas, aminoácido presente en abundancia en las HGRPs. La formación de esta red glicoproteica aumenta la rigidez de las paredes celulares haciéndolas más resistentes a la acción de las enzimas degradativas microbianas (Brisson, 1994). Por otra parte, se estimula la transcripción de peroxidasas y HGRPs y PRPs ricas en tirosina, por lo que esta respuesta rápida inicial es seguida de un aumento en la capacidad de reforzar las paredes celulares.

Las peroxidasas intervienen, además, en la síntesis de suberina y lignina, polímeros que contribuyen a formar una barrera de contención contra la invasión (Bowles, 1990).

Enzimas líticas y proteínas relacionadas a la patogénesis

Las quitinasas y las β -1,3-glucanasas son enzimas que están comunmente presentes en numerosas plantas; ambas han sido involucradas en las reacciones de defensa contra patógenos fúngicos. Su síntesis es estimulada por estos microorganismos, sus *elicitors* y por etileno, y tienen la propiedad de inhibir el crecimiento fúngico *in vitro*. Estas enzimas están codificadas por familias multigénicas, de regulación compleja pero coordinada, de modo que distintos estímulos —p.ej., maduración de semillas, infección fúngica, daño mecánico, etc— producen un patrón de expresión diferente (Mauch *et al.*, 1988). Se han encontrado varias isoformas de estas enzimas con puntos isoeléctricos ácidos y básicos (Kauffmann *et al.*, 1987). Estudios citológicos revelaron que las formas básicas se concentran en vacuolas citoplasmáticas y las ácidas en las paredes celulares, lo que da un indicio acerca de que la función de estas últimas consistiría en liberar fragmentos de la pared fúngica que actuarían como *elicitors* (Kombrink *et al.*, 1988; Joosten y De Wit, 1989).

Las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) pertenecen a otro grupo de proteínas producidas en las plantas en respuesta a infecciones generadas por virus, bacterias y hongos. Si bien han sido bien caracterizadas en términos de sus pesos moleculares, puntos isoeléctricos, modo de inducción e incluso se han clonado algunos genes correspondientes a las mismas, su rol en la patogénesis aún no ha sido dilucidado.

Síntesis de fitoalexinas

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, que se sintetizan en las plantas en respuesta a una infección (Hargreaves y Bailey, 1978; Holliday *et al.*, 1981). Estos metabolitos han sido aislados a partir de diversas familias como Leguminosae, Solanaceae, Orchidaceae y Gramineae (Isaac, 1992). Se originan a partir del metabolismo central de los fenilpropanoides e incluyen compuestos como flavonoides, cumarinas, terpenoides y esteroides. Todos los fenilpropanoides son derivados del ácido *trans*-cinámico, que se forma a partir de la fenilalanina por acción de la fenilalanil amonio-liasa (PAL). En la fig. 4 se muestran las relaciones biosintéticas entre los principales compuestos.

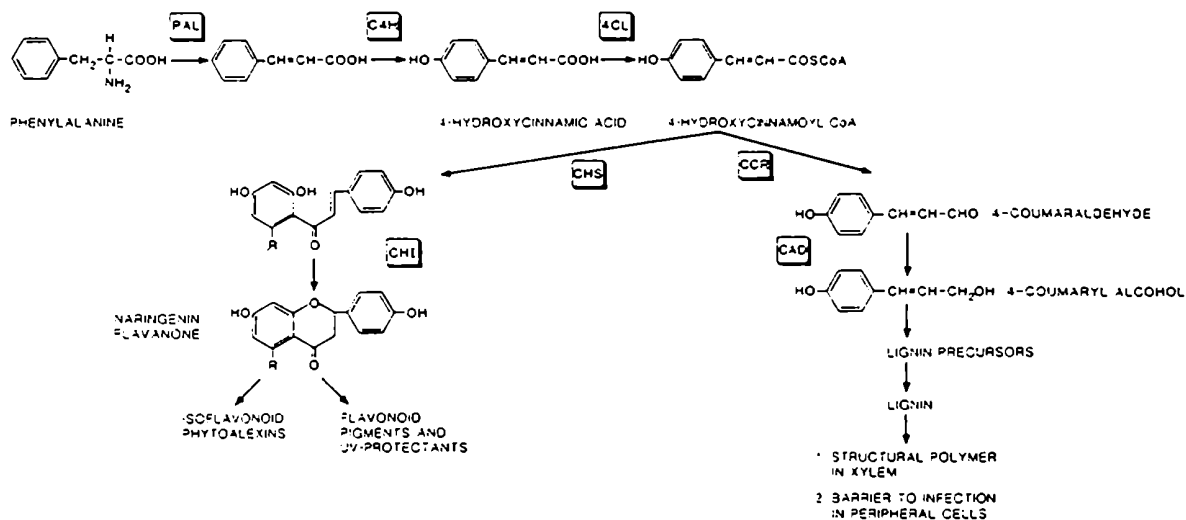


Fig. 4: Ruta biosintética de fenilpropanoides derivados de la fenilalanina. PAL: fenilalanil amonio-liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato-CoA ligasa; CHS: chalcona sintetasa; CHI: chalcona isomerasa; CCR: 4-cumaroil-CoA reductasa; CAD: cinamil-alcohol dehidrogenasa.

Las fitoalexinas se acumulan alrededor del sitio de infección, llegando a concentraciones tales que resultan tóxicas para los patógenos en ensayos *in vitro* (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Sin embargo, sus niveles de síntesis son muy variables y dependen de numerosos factores, como ser el estado fisiológico de la planta y su composición genética. Algunas especies fitopatógenas son capaces de inactivarlas o detoxificarlas, mientras que otras pueden tolerar su presencia sin necesidad de degradarlas, lo que podría jugar un papel importante en la patogenicidad.

La primera demostración directa de la importancia de la síntesis de fitoalexinas en el conjunto de respuestas de defensa fue provista por la transformación de plantas de tabaco con el gen de la estilbeno sintetasa proveniente de uva. Como resultado se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco con capacidad de sintetizar la fitoalexina resveratrol que mostraban un aumento en la resistencia al patógeno fúngico *Botrytis cinerea* (Hain *et al.*, 1993).

En todos los sistemas estudiados, la acumulación de fitoalexinas y otros compuestos derivados del metabolismo de fenilpropanoides en respuesta a distintas condiciones de stress es el resultado

de un aumento en la transcripción de los genes que codifican las enzimas correspondientes (Dixon y Paiva, 1995).

Respuesta hipersensitiva

La resistencia de una especie vegetal a un patógeno puede ser visualizada, generalmente, mediante la respuesta hipersensitiva, que se caracteriza por una necrosis celular en el sitio de penetración del patógeno (Keen *et al.*, 1993), de resultas de lo cual el patógeno queda aislado dentro de estas zonas necróticas y la infección no se extiende a regiones sanas de la planta. Se ha observado que las células infectadas pierden rápidamente turgencia, aumentan su actividad respiratoria, acumulan compuestos fenólicos y fitoalexinas, y se produce un incremento de reacciones de oxidación. Sin embargo, la resistencia no siempre involucra una HR visible, lo cual puede indicar o bien que la HR está limitada a células individuales, o bien que se está manifestando otro mecanismo de defensa aún no caracterizado (Staskawicz *et al.*, 1995).

El hecho de que la HR pueda ser inducida por *elicitors* sugiere que la muerte celular durante la HR no está causada directamente por el patógeno invasor, sino, más bien, que es el resultado de la activación de una muerte celular programada (mcp). La activación de la HR requiere un metabolismo activo, que incluye la transcripción y la traducción de genes, lo que refuerza la idea de que habría genes de muerte celular en el genoma de la planta que serían activados en respuesta a una infección.

La **apoptosis** es un caso específico de mcp que ha sido extensivamente estudiado en animales. Se ha demostrado que está regulada por genes como *bcl-2*, un proto-oncogen que bloquea la apoptosis en ratones (Hockenbery *et al.*, 1993), y *dad 1*, que fue inicialmente identificado como un gen que inhibe la apoptosis en una línea celular termosensible de hamster (Nakashima *et al.*, 1993).

La identificación de mutantes de maíz, cebada y arábidopsis, que desarrollan lesiones de HR espontáneas —no requieren de la presencia del patógeno o *elicitors* microbianos para la inducción de la HR— aportaron las primeras evidencias de que existirían genes que regulan la mcp en las plantas (Greenberg *et al.*, 1993, 1994; Dietrich, 1994). Recientemente, se han clonado genes homólogos a *dad 1* en arroz y arábidopsis (Apte *et al.*, 1995; Sugimoto *et al.*, 1995).

La apoptosis se caracteriza por la condensación y vacuolización del citoplasma, la condensación del material nuclear y la fragmentación del núcleo. Estas alteraciones preceden el colapso de las

células y la formación de cuerpos apoptóticos que son engolfados por las células vecinas o por macrófagos; como contrapartida, durante éste proceso las mitocondrias permanecen estables. En las plantas, las células que están llevando a cabo la HR presentan algunas de las características típicas de la apoptosis, incluyendo la condensación y vacuolización del citoplasma, la no alteración de las mitocondrias y el colapso celular. Sin embargo, la mcp de las plantas no reúne todas las características de la apoptosis observadas en células animales. Prueba de ello es que el material nuclear no se condensa en la periferia de la envoltura nuclear, no hay fragmentación del núcleo y no se forman cuerpos apoptóticos que son engolfados por células vecinas (Mittler y Lam, 1996). En la muerte celular que ocurre durante la HR el contenido celular degradado es vertido al espacio intercelular.

Otra característica fisiológica particular de la apoptosis es la activación, en las células que están muriendo o en las vecinas, de nucleasas específicas. La activación de estas nucleasas da como resultado la fragmentación del DNA nuclear en multímeros de 180 pb, que se detectan en geles de agarosa como una «escalera de DNA». Recientemente, Ryerson y Heath (1996) demostraron que la infección con *Uromyces vignae* de plantas de cowpea resistentes a este patógeno induce el «escalonamiento del DNA», resultado que también fue observado por Wang *et al.* (1996) en células de tomate tratadas con toxinas fúngicas. En contraste, en tabaco infectado con TMV, Mittler y Lam (1995) encontraron un aumento de la actividad de nucleasas en las etapas tardías de la HR, y, si bien el DNA se hallaba fragmentado, no visualizaron el característico escalonamiento de éste. Es posible, por tanto, que se activen diferentes nucleasas durante la HR inducida en respuesta a la infección generada por distintos organismos, como hongos o virus.

A pesar de que las plantas se diferencian de los animales en muchos aspectos subcelulares, celulares y anatómicos, pareciera que las plantas utilizan una estrategia de eliminación celular para combatir la infección por patógenos similar a la de aquellos. Así, el sacrificio de un pequeño número de células para prevenir la infección sistémica debida a virus, bacterias u hongos podría ser una estrategia conservada de defensa de los organismos multicelulares. Sin embargo, a pesar de que los hallazgos recientes refuerzan la hipótesis que sostiene que la muerte celular durante la HR sería una clase de mcp, aún restan por encontrarse evidencias concluyentes que la avalen.

Resistencia sistémica

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es el fenómeno por el cual una planta que ha sido inoculada con un patógeno desarrolla resistencia a una inoculación secundaria realizada en otras hojas con el mismo patógeno y a la infección por un amplio rango de otros microorganismos causantes de enfermedades (Ryals *et al.*, 1994). Generalmente, esta resistencia se desarrolla 2 o 3 días luego de la aparición de la lesión necrótica de la respuesta hipersensitiva y dura por varias semanas (Enyedi *et al.*, 1992).

Durante el período de expresión de SAR se sintetiza un grupo de proteínas que están codificadas por los denominados «genes SAR», e incluyen a quitinasas, glucanasas, y numerosas proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), cuya función es aún desconocida (Ward *et al.*, 1991). En tabaco el producto de estos genes corresponde al 3-5% del mRNA total perteneciente a aquellas hojas inoculadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV) y al 0.3-1% del mRNA total de hojas no infectadas (Lawton *et al.*, 1995).

Este tipo de resistencia provee a la planta de una tercera línea de defensa para prevenir la infección de origen microbiano, que se sumaría a las aportadas por los mecanismos de resistencia preexistentes estructurales y bioquímicos que hacen a las plantas constitutivamente resistentes a patógenos, y a la respuesta hipersensitiva.

A diferencia de los animales, las plantas no poseen un sistema circulatorio que permita transportar células y una suficiente cantidad de compuestos para combatir las infecciones, de modo que dependen de moléculas señales transmisibles que, a bajas concentraciones, puedan activar los mecanismos de defensa en células que no están directamente invadidas por el patógeno. Por estudios moleculares y bioquímicos han sido identificadas varias moléculas como potenciales señales sistémicas en SAR. Estas son el ácido salicílico (AS), la sistemina, el jasmonato, el metil-jasmonato y el etileno. Tanto el etileno, la sistemina como los ácidos jasmónico y metil-jasmónico están asociados a heridas mecánicas y daños producidos por patógenos, mientras que el AS no es inducible por heridas y está específicamente asociado a la respuesta SAR. Esto implica que la planta podría tener al menos dos mecanismos paralelos de transducción de señales para activar SAR. Uno mediado por AS, que es específico de la respuesta hipersensitiva resultante de la infección por patógenos, y otro, que es activado por daño en los tejidos causado por insectos, nematodos, etc. Parecería que la transducción de señales que conduce a la respuesta sistémica no puede distinguir entre patógenos virales, bacterianos y fúngicos, dando como resultado la inducción de la síntesis de un grupo idéntico de proteínas PR. Esta pérdida de especificidad en SAR podría explicar el hecho de que un virus

necrotizante induce sistemáticamente quitinasas y glucanasas, las cuales solo podrían proveer protección contra bacterias u hongos.

Una evidencia directa del rol del AS en SAR fue provista por Gaffney y col. (1993). Se produjeron plantas de tabaco que expresaban constitutivamente el gen *nahG* de *Pseudomonas putida*. Este gen codifica una salicilato hidroxilasa, enzima que convierte el AS en catecol, compuesto fenólico sin actividad inductora de SAR. El análisis de las plantas transgénicas mostró que eran defectivas en el establecimiento de SAR, resultado que también se observa en *A. thaliana* (Delaney, 1994). Sin embargo, no está claro aún si el AS actúa como la señal primaria que es translocada desde el sitio de infección a los tejidos distales. Se ha sugerido que la infección local induce la producción de un componente móvil que a su vez requeriría, en tejidos distales, al AS para el establecimiento de SAR (Klessig y Malamy, 1994).

Patrones genéticos de las interacciones huésped-parásito

Las interacciones entre microorganismos fitopatógenos con las plantas potencialmente hospedadoras puede dividirse en dos categorías: **interacción compatible**, definida por la habilidad de un microorganismo de causar enfermedad en una planta susceptible, e **interacción incompatible**, que resulta en una resistencia específica a la infección producto de la inducción de respuestas de defensa de la planta.

El análisis a nivel molecular de la resistencia a enfermedades reveló que hay dos patrones genéticos que describen las interacciones incompatibles: el primero está asociado a la variabilidad en la producción de *factores de compatibilidad* del patógeno y a la variabilidad en la susceptibilidad por parte de la planta a estos factores; entendiéndose por factores de compatibilidad a aquellos que producen cambios fisiológicos en las plantas que las hacen susceptibles a la infección. La incompatibilidad en este caso resulta de la habilidad de la planta de inactivar el factor de compatibilidad del patógeno. El segundo patrón está asociado a la variabilidad en la producción de *factores de incompatibilidad* (o de avirulencia) por parte del patógeno y a la variabilidad en la susceptibilidad de la planta a estos factores; entendiéndose por factores de incompatibilidad a aquellos que producen cambios en la fisiología de la planta que conducen a una resistencia a la infección. La habilidad de una planta de reconocer un factor de incompatibilidad resulta en una respuesta que previene la infección (Brigs y Johal, 1995).

En síntesis, la resistencia a infecciones y la capacidad infectiva son atributos condicionales: la resistencia al parásito de la planta huésped depende del genoma del microorganismo patógeno y la capacidad infectiva de los patógenos depende del genoma de la planta huésped.

Basado en sus análisis genéticos de la interacción de *Linum usitatissimum* (lino) con el hongo biotrófico *Melampsora lini*, Flor (1956) postuló la hipótesis de **gen-por-gen**: por cada gen que condiciona la resistencia en el huésped, hay un gen complementario en el parásito que condiciona la patogenicidad. Flor encontró que la resistencia de una determinada variedad de lino a una determinada cepa del hongo era un carácter dominante o semidominante, mientras que en el patógeno, la avirulencia era siempre dominante sobre la virulencia. En esta categoría de interacciones la incompatibilidad resulta cuando una planta que posee un gen de resistencia (R) se enfrenta con una raza del patógeno que contiene un gen de avirulencia (*avr*) complementario (Fig. 5).

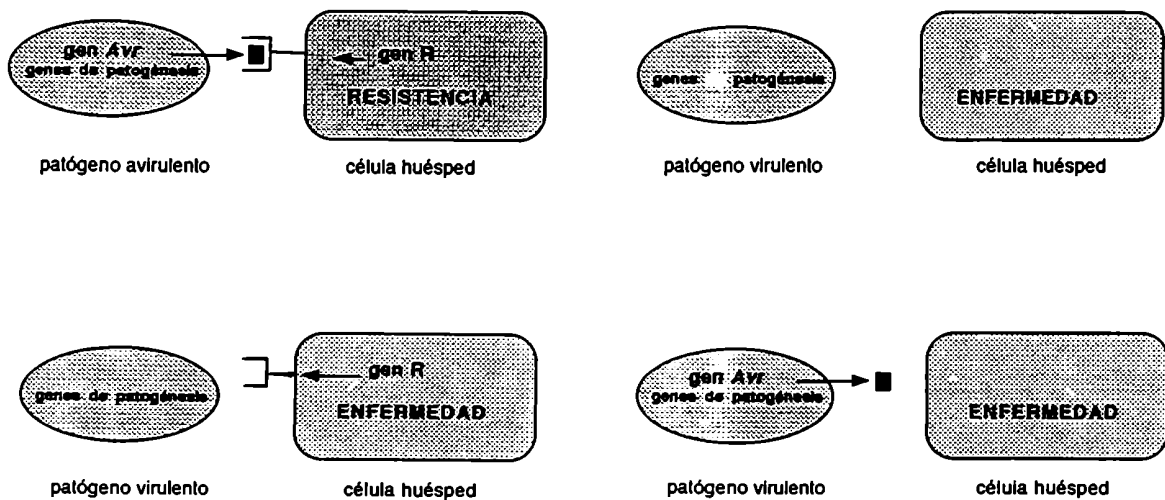


Fig. 5: Interacción gen-por-gen: La resistencia se manifiesta solamente cuando una planta que contiene un gen de resistencia específico reconoce un patógeno que posee el correspondiente gen de avirulencia.

La hipótesis sugiere que los productos de los genes R y *avr* de algún modo mediarían un evento de reconocimiento entre la planta y el patógeno requerido para disparar las respuestas de defensa. La capacidad de la planta de "reconocer" directa o indirectamente un factor de incompatibilidad

(el producto de un gen *avr* en particular) resulta en una respuesta de defensa que previene la infección; la ausencia de cualquiera de los miembros de este par génico (*R-avr*) resulta en una interacción compatible (enfermedad).

El primer gen de resistencia de una planta que fue clonado, el gen *Hm1* de maíz, responde al primer patrón genético descrito. Las toxinas producidas por algunos microorganismos actúan como factores de compatibilidad que otorgan especificidad de huésped. El patógeno de maíz *Cochliobolus carbonum* raza 1 sintetiza una toxina (toxina-HC) que es requerida para la extensiva colonización de genotipos susceptibles de maíz. La toxina-HC es un tetrapéptido cíclico (Walton *et al.*, 1982) cuya síntesis está catalizada por un péptido sintetasa multifuncional (Walton y Holden, 1988). La enzima está codificada por el gen *HTS1* que está localizado en el locus *Tox2* (Scott-Craig *et al.*, 1992), un fragmento de 22-Kb que está duplicado en el genoma de *C. carbonum* raza 1 pero que está ausente en las razas no productoras de la toxina-HC (Panaccione *et al.*, 1992). La disrupción del gen *HTS1* conduce a la pérdida de la habilidad de producir la toxina y consecuentemente a la avirulencia. Por otra parte, las plantas de maíz que son resistentes a la infección por *C. carbonum* contienen en su genoma el gen dominante *Hm1*. Este fue el primer gen *R* al que se le pudo atribuir una función específica: el producto del mismo es una reductasa NADPH-dependiente que detoxifica a la toxina-HC producida por razas del hongo *Cochliobolus carbonum* raza 1 (Meeley *et al.*, 1992).

Este modelo demuestra claramente cómo el producto de un gen de un patógeno interacciona directamente con el producto de un gen de una planta. Sin embargo, en este caso el producto del gen *R* interviene inactivando un factor de compatibilidad producido por el patógeno en lugar de reconociendo un factor de incompatibilidad producido por el mismo.

La primera evidencia de la interacción directa entre el producto de un gen *avr* con células vegetales fue obtenida a partir del análisis de la interacción entre *Cladosporium fulvum* y tomate. De Wit y colaboradores detectaron un pequeño péptido en hojas de tomate infectadas solo cuando eran inoculadas con cepas de *Cladosporium fulvum* que contenían el gen de avirulencia *avr9* (Van Kan *et al.* 1991, Van den Ackerveken *et al.* 1992). El producto de *avr9* es un péptido de 20 aminoácidos rico en cisteínas. Este péptido purificado a partir de la raza del patógeno que posee el gen *avr9* actúa como un *elicitor* específico estimulando una rápida necrosis (HR) en la zona de infección en tomates que poseen el gen de resistencia *Cf-9*. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen *Cf-9* reveló que contiene 28 dominios de RRLs (repeticiones ricas en leucina) de 24 aminoácidos, un probable péptido señal, 2 dominios cargados flanqueando un región trans-membrana y una cola citoplasmática muy corta. Esta clase de estructura sumada al hecho de que es frecuente encontrar dominios RRLs en proteínas

vegetales y animales que están involucradas en interacciones del tipo proteína-proteína y en receptores que unen ligandos (Kobe y Deisenhofer, 1994), sugiere que la proteína Cf-9 es un receptor para el elicitor Avr9, aunque la interacción directa entre Cf-9 y Avr9 aún no ha sido demostrada. Si CF-9 es un receptor trans-membrana y sus dominios RRLs unen directamente el péptido Avr9 entonces el dominio citoplasmático de CF-9 podría activar una protein-quinasa que inicie una cascada de transducción de señales conduciendo a la expresión de resistencia en la planta.

Otros genes R clonados hasta el presente incluyen los genes: N de tabaco (Whitham et al., 1994), Pto de tomate (Martin et al., 1993), L⁶ de lino (Ellis et al., 1995) y RPS2 de Arabidopsis (Bent et al., 1994, Mindrinos et al., 1994) que confieren resistencia al virus del mosaico del tabaco, a cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) que llevan el gen *avrPto*, a *Melampsora lini* y a *P. syringae* pvs. tomato y maulicola que expresan el gen de avirulencia *avrRpt2* respectivamente. A excepción de Pto, todos los demás genes R comparten la característica de presentar un número variable de dominios RRLs (Dangl, 1995). Pto es una serin-treonin quinasa citoplasmática que forma parte de una familia de genes de quinasas entre los que se incluye *Fen*, que codifica para una proteína 80% homóloga a Pto que confiere sensibilidad al insecticida fentión (Martin et al., 1994). Análisis por mutagénesis revelaron un tercer gen, *Prf*, requerido para el funcionamiento de Pto y Fen. (Salmeron, et al., 1994). La secuencia de Prf demostró que contiene dominios RRLs y varios potenciales dominios trans-membrana, por lo que se podría inferir que o bien actúa como un receptor común pudiendo unirse tanto a *avrPto* como a Fen o actuaría en un paso posterior.

Interacción Sclerotinia sclerotiorum-Huéspedes susceptibles

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary es un hongo fitopatógeno que pertenece a la Clase Ascomycetes, SubClase Euascomycetes, Serie Discomycetes, Orden Helotiales, Familia Sclerotiniaceae (Zimmer y Hoes, 1978; Kohn, 1979). Se caracteriza por su gran agresividad y polifagia, es un patógeno inespecífico que puede atacar 361 especies vegetales (Purdy, 1979).

El micelio, blanco y de aspecto algodonoso, está formado por hifas muy ramificadas y tabicadas. Puede desarrollarse tanto en la superficie como en el interior de los órganos atacados. Cuando las condiciones ambientales son adversas, p.ej., por escasez de nutrientes, se producen **esclerocios**, cuerpos de resistencia formados por la anastomosis de las hifas. El tamaño de los esclerocios es variable, oscilando en general entre los 2 y 10 mm, están constituidos por una

corteza de hifas de paredes melanizadas, oscuras y muy engrosadas; y una médula parenquimatosa laxa (Lamarque, 1976).

El ciclo de vida de *S. sclerotiorum* consta de una fase asexual y una sexual que tienen como nexo de unión a los esclerocios. Cuando las condiciones ambientales son favorables, el esclerocio germina sobre materia orgánica muerta produciendo micelio (germinación miceliogénica); si se encuentra en la cercanía del hospedante, el hongo invade los tejidos del tallo y sobre la superficie de la planta se desarrolla el micelio a partir del cual se forman esclerocios que reiniciarán el ciclo al incorporarse al suelo con la caída del órgano enfermo o en los restos de la cosecha.

En otras condiciones el esclerocio produce 1 a 8 estípites (germinación carpogénica) portando cada uno 1 apotecio. Aquí se inicia la fase sexual del ciclo de vida. Una vez maduras, las ascosporas son liberadas y transportadas por el viento hasta las partes aéreas de las plantas, en donde germinan dando origen a micelio. Como consecuencia se produce la podredumbre total o parcial del órgano atacado. El ciclo se cierra con la formación de nuevos esclerocios sobre la superficie o en el interior de los órganos atacados.

Las enfermedades producidas por *S. sclerotiorum* son de difícil control debido a que no se cuenta con cultivares resistentes a la infección y a que los esclerocios permanecen en el suelo o en los restos de la cosecha conservando su viabilidad por largos períodos, pudiendo llegar hasta los 8 años.

La patogénesis debida a este microorganismo es compleja. El hongo produce enzimas líticas —poligalacturonasas, celulasas, hemicelulasas y pectinasas— necesarias para degradar los componentes estructurales de las paredes celulares de las plantas (Hancock, 1966; Hancock 1967; Bauer, 1977; Marciano *et al.*, 1982; Favaron *et al.*, 1992). La secreción de este vasto conjunto de enzimas le facilitaría la colonización de huéspedes que muestren diferentes composiciones de polisacáridos en las paredes celulares y podría explicar la falta de especificidad de huésped que lo caracteriza (Riou *et al.*, 1991).

Por otra parte, *S. sclerotiorum* produce ácido oxálico, el cual actúa como una toxina móvil de distribución sistémica que se acumularía en el follaje produciendo la marchitez foliar (Noyes y Hancock, 1981). También se sugirió que tendría la función de disminuir el pH de los tejidos atacados favoreciendo de este modo la acción de las enzimas fúngicas (Maxwell y Lumsden, 1970). No obstante, a pesar de que las mencionadas moléculas podrían estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad, el factor determinante de una infección exitosa aún no ha sido establecido.

Con respecto a los mecanismos de defensa de los distintos huéspedes frente a *S. sclerotiorum* es muy escasa la información disponible, careciéndose en general, y en particular en zanahoria, de

antecedentes previos. En 1984, Sutton y Deverall describieron que tanto en poroto como en soja se produce la acumulación de las correspondientes fitoalexinas en las primeras etapas de la infección. En girasol, Bazzalo (1985) encontró una correlación entre la acumulación de ácido clorogénico y la tolerancia a la podredumbre basal en el estadio de botón floral cerrado; por otra parte, Mouly y col. (1992) hallaron una diferencia en la cinética de acumulación de mRNA correspondientes a HGRPs al comparar una línea tolerante a la infección por *S. sclerotiorum* con una susceptible, detectandose los 48 hs antes en la línea tolerante.

En consecuencia, el objetivo del presente trabajo de tesis ha sido profundizar el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre *Sclerotinia sclerotiorum* y un huésped susceptible, *Daucus carota*.

El análisis a nivel molecular de las interacciones planta-patógeno ha permitido el hallazgo de genes de resistencia, por lo que la búsqueda sistemática de genes cuya transcripción es activada o inhibida luego de la incubación de cultivos celulares vegetales con *elicitors* fúngicos podría conducir al desarrollo de nuevos métodos y herramientas que permitan el control de enfermedades. Con este propósito, se aisló y caracterizó un *elicitor* proveniente de la pared celular de *S. sclerotiorum*, que fue utilizado para la identificación, clonado y secuenciación de genes de zanahoria diferencialmente expresados en respuesta al mismo.

CAPITULO 2

**ASPECTOS DE LA INTERACCIÓN *DAUCUS CAROTA-*
SCLEROTINIA SCLEROTIORUM Y CARACTERIZACIÓN
PARCIAL DEL ELICITOR FÚNGICO**

ANTECEDENTES

Una revisión de los trabajos previos llevados a cabo para estudiar la interacción entre *Sclerotinia sclerotiorum* y huéspedes susceptibles muestra que los mismos se realizaron utilizando tejidos o plantas enteras infectadas con micelio o esporas (Sutton y Deverall, 1984; Bazzalo *et al.* 1985; Mouly *et al.*, 1992; Favaron *et al.*, 1992). Sin embargo, para examinar los mecanismos moleculares básicos de las respuestas de las células vegetales a una infección, el uso de estos sistemas biológicos no resulta muy conveniente; esto es así debido a que la invasión por el patógeno rara vez ocurre de manera sincronizada y solo un pequeño número de células están involucradas en la respuesta.

Se ha descrito que la naturaleza bioquímica y la cinética de las reacciones observadas en cultivos de células vegetales desdiferenciadas incubadas en presencia de un extracto crudo de paredes fúngicas son muy similares a aquellas respuestas de defensa que tienen lugar en la naturaleza, cuando el tejido intacto (totalmente diferenciado) de la misma planta es infectado por el hongo (Schal *et al.* 1986, Jahnen y Hahlbrock 1988, Schmelzer *et al.* 1989). El uso de estos sistemas biológicos de complejidad reducida ha permitido el aislamiento y caracterización de numerosos *elicitors* a partir de diversos microorganismos, así como también ha facilitado el análisis bioquímico de las respuestas de defensa y la identificación y clonado de una gran cantidad de genes involucrados en la interacción entre plantas y patógenos.

Para comenzar a estudiar a nivel molecular los efectos producidos en las plantas de zanahoria en relación a una infección con *Sclerotinia sclerotiorum*, se decidió optar por un sistema modelo que consiste en cultivos de una línea celular de zanahoria en suspensión y un extracto de la pared del hongo.

En este capítulo se describe la identificación, purificación y caracterización parcial de un *elicitor* proveniente de la pared de *Sclerotinia sclerotiorum*. Como se describió en la introducción, es común en las reacciones de defensa de las plantas la inducción del metabolismo de los fenilpropanoides. Estos compuestos son derivados del ácido *trans*-cinámico, que se sintetiza a partir de la fenilalanina por acción de la enzima fenilalanil amonio-liasa (PAL). En el presente trabajo se utilizó la inducción de la actividad de esta enzima como test biológico para seguir el aislamiento y purificación del compuesto *elicitor*. En todos los casos, los resultados de los ensayos realizados sobre células de zanahoria en cultivo corresponden a por lo menos tres experimentos independientes.

Efecto del agregado del extracto de pared de *S. sclerotiorum* sobre cultivos de zanahoria

El agregado de un extracto de paredes fúngicas proveniente de *Sclerotinia sclerotiorum* (extracto elicitor crudo-EEC) a un cultivo en suspensión de zanahoria de 7 días desencadena un efecto visible en las células: a las pocas horas las células comienzan a oscurecerse (fig. 6), probablemente debido a la acumulación de compuestos fenólicos.

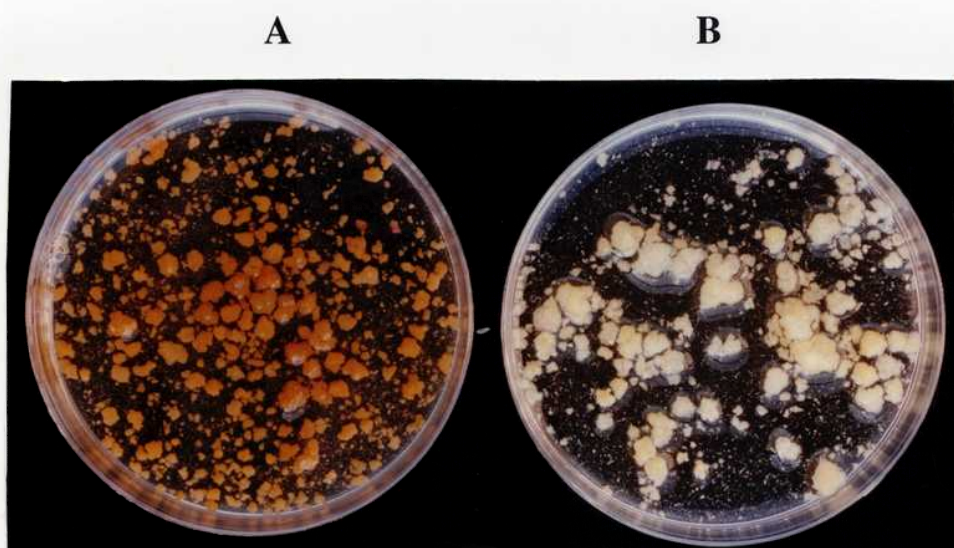


Fig. 6: Cultivos en suspensión de células de zanahoria. (A) Cultivo incubado durante 48 h con el extracto elicitor crudo proveniente de *S. sclerotiorum*. (B) Cultivo control.

Por otra parte, el agregado del EEC sobre los cultivos promueve un cambio en el patrón de expresión de proteínas de las células de zanahoria. Esta reacción puede observarse cuando se realiza un pulso de 15 min con [³⁵S]-Metionina al cabo de 5 h de incubación de las células con el EEC. En la fig. 7 se muestra la autoradiografía de un gel de SDS-PAGE en el que se comparan las proteínas obtenidas a partir de un cultivo incubado con el EEC y las obtenidas a partir de cultivos controles no inducidos.

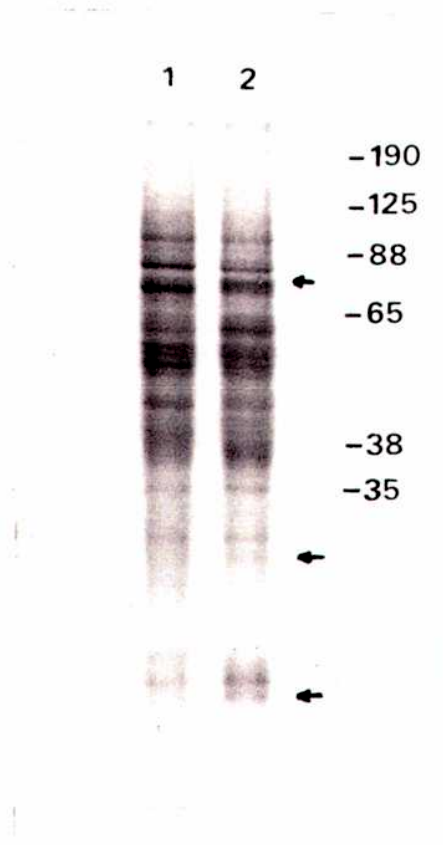


Fig. 7: Comparación de las proteínas extraídas a partir de cultivos de zanahoria incubados con el EEC de *S. sclerotiorum* y cultivos controles. Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 10%. La radioactividad fue detectada por fluorografía y autoradiografía. *Calle 1:* proteínas extraídas a partir del cultivo control, *calle 2:* proteínas extraídas a partir del cultivo incubado con el EEC. Las flechas señalan proteínas diferencialmente expresadas. Los números de la derecha representan los pesos moleculares de los marcadores en KDa.

Cuando se determinó la actividad enzimática de la PAL se observó que su actividad basal en los cultivos de zanahoria es muy baja —con valores de 0.5 a 1.5 μ moles *t*-cinámico/h/mg proteína— y que el agregado del EEC promueve un pronunciado incremento de su actividad.

En conjunto, estos resultados sugirieron que algún componente presente en el extracto crudo de pared de *S. sclerotiorum* es reconocido por las células de zanahoria e induce grandes cambios metabólicos en las mismas. A semejanza de lo observado en otros sistemas, este componente actuaría como un *elicitor*.

Con el propósito de seleccionar las condiciones óptimas de inducción de la PAL y caracterizar esta respuesta, se realizaron los experimentos que se describen a continuación:

Variaciones de la actividad de la PAL durante el ciclo de crecimiento del cultivo en suspensión de zanahoria

A distintos tiempos del ciclo de crecimiento, los cultivos de zanahoria fueron inoculados con extracto crudo de pared fúngica (10 μg de glucosa equivalentes/ml de cultivo); luego de 15 h de incubación, las células fueron cosechadas y la actividad de la PAL fue estimada como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS. Los resultados se muestran en la fig. 8.

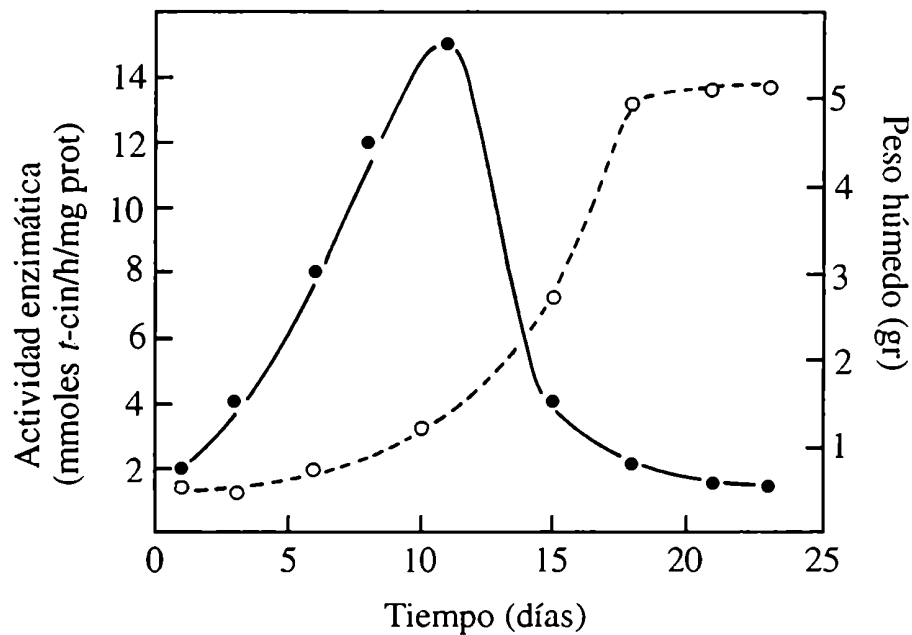


Fig. 8: Cambios en la actividad de la PAL a lo largo del ciclo de crecimiento de células de zanahoria. La actividad enzimática fue determinada como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS. Los valores de actividad enzimática correspondiente a los cultivos controles fueron sustraídos de los obtenidos a partir de los cultivos inducidos con el EEC.

La máxima actividad enzimática fue hallada en cultivos de alrededor de 10 días, momento que corresponde al inicio de la fase de crecimiento exponencial de las células. Es decir que la

capacidad de respuesta de las células en cultivo se correlaciona con un aumento en su actividad metabólica. Por otra parte, el crecimiento de las células, medido como incremento en el peso húmedo, cesa luego del agregado del EEC.

Actividad de la PAL en función del tiempo de incubación con el EEC

Se inocularon cultivos de zanahoria de 10 días con extracto elicitor crudo de *S. sclerotiorum* (10 $\mu\text{g/ml}$); a distintos tiempos de incubación con el EEC se tomaron muestras de células y se determinó la actividad enzimática (Fig. 9).

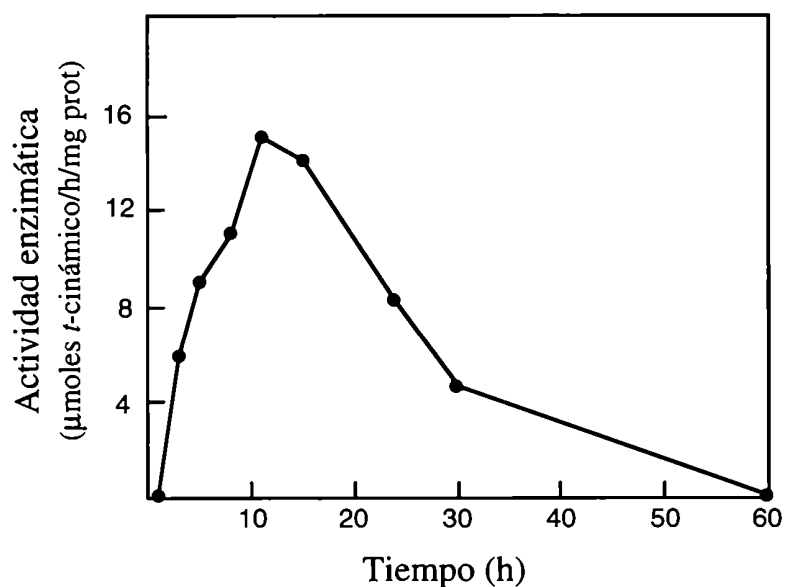


Fig. 9: Inducción de la PAL en cultivos de zanahoria. Los cultivos fueron incubados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de EEC de *S. sclerotiorum*. Paralelamente, los cultivos controles recibieron agua. Los valores de actividad enzimática medida en los cultivos controles fueron sustraídos de los obtenidos a partir de los cultivos inducidos con el EEC.

La actividad enzimática de la PAL se estimula transitoriamente; comienza a aumentar a partir de las 2 horas de exposición al extracto crudo de pared de *S. sclerotiorum*, y alcanza un máximo a las 11 horas. A partir de las 30 horas de incubación presenta sólo un 25 % de la actividad máxima. A las 60 h se observa que la actividad ha retornado a su nivel basal.

Actividad de la PAL en función de la concentración del extracto elicitor crudo de pared

Cultivos en suspensión de células de zanahoria fueron incubados con distintas concentraciones de EEC. Las células fueron cosechadas a las 11 h y se determinó la actividad de la PAL. Como puede observarse en la fig. 9, los cultivos son extremadamente sensibles a pequeñas cantidades del EEC.

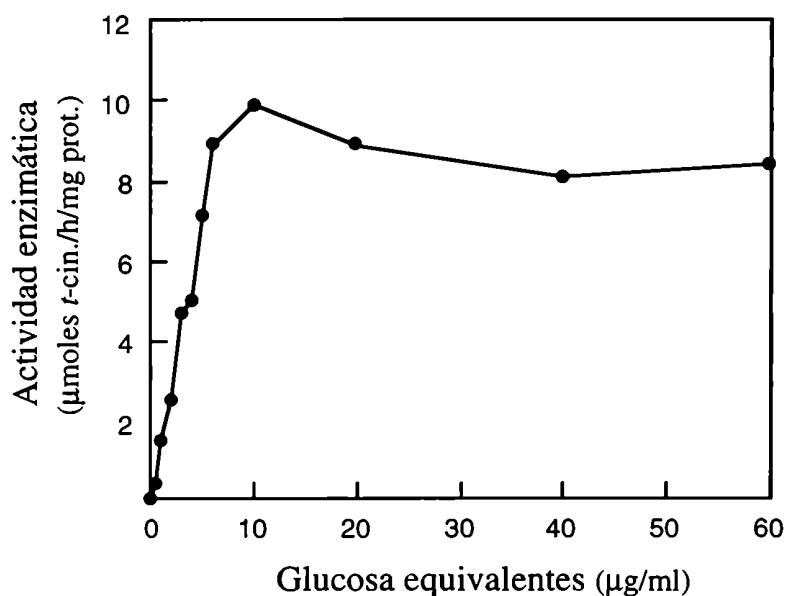


Fig. 9: Cambios en la actividad de la PAL en función de la concentración del EEC. Los cultivos en suspensión de zanahoria de 10 días de crecimiento fueron incubados durante 11 horas con concentraciones crecientes de EEC expresadas como μg/ml de glucosa equivalentes. La actividad de PAL fue determinada como se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS.

Aunque las células de zanahoria fueron crecidas en presencia de 60 mM de sacarosa, el agregado de cantidades micromolares de *elicitor* (expresado en equivalentes de glucosa) produjo una inducción de la PAL en el orden de 10 veces. La máxima estimulación de la actividad enzimática resultó del agregado de 10 µg/ml de EEC, a partir de esta concentración, el estímulo fue el mismo, sugiriendo una respuesta saturable.

En base a estos resultados, para los ensayos biológicos de medición de la PAL durante el proceso de aislamiento y purificación del *elicitor* se emplearon cultivos de zanahoria de 11 días que fueron incubados durante 11 a 15 h con las fracciones a ensayar.

Naturaleza química del elicitor de *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamiento del extracto crudo con proteasas y glicosidasas

Como se mencionara en la introducción, la mayoría de los *elicitors* fúngicos descritos son componentes estructurales de la paredes miceliales, fundamentalmente de naturaleza glicosídica o protéica. Tomando en consideración estos antecedentes, se analizó de qué modo el tratamiento del extracto *elicitor* con glicosidasas o proteasas afectaba su actividad inductora de la PAL en los cultivos de zanahoria. El EEC fue incubado con estas enzimas según se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS. Al término de las respectivas incubaciones, las enzimas fueron inactivadas por calentamiento a 100 °C durante 3 min. Con las fracciones que se indican en la tabla 1 y 2 se inocularon células de zanahoria de 11 días. A las 15 h las células fueron cosechadas y se les midió la actividad enzimática.

TABLA 1: TRATAMIENTO CON PROTEASAS

Fracción	Actividad enzimática (PAL) ^a
EEC + Proteasa	12.2
H ₂ O + Proteasa	3.1
Proteasa + 3 min 100 °C + EEC	12.1
H ₂ O	2.0
EEC	15.0

a: Los resultados se expresan en μ moles de *t*-cinámico/h/mg proteína

TABLA 2: TRATAMIENTO CON GLICOSIDASAS

Fracción	Actividad enzimática (PAL) ^a
EEC + Glusulasa	0.8
H ₂ O + Glusulasa	3.1
Glusulasa + 3 min 100 °C + EEC	8.1
H ₂ O	0.6
EEC	10.0

a: Los resultados se expresan en μ moles de *t*-cinámico/h/mg proteína

Se concluye a partir de los resultados mostrados en las tablas 1 y 2, que el tratamiento exhaustivo con proteasas no modifica la capacidad del extracto crudo de pared fúngica de inducir la actividad de la PAL en los cultivos de zanahoria. Por otra parte, el tratamiento exhaustivo con glicosidasas anula completamente este efecto. Tomando en consideración que el extracto crudo es estable frente a un tratamiento térmico de 1 h a 121 °C a 1 atm y, sumado al hecho de que los lípidos son eliminados en el proceso de preparación del EEC (ver MATERIALES Y MÉTODOS), los resultados obtenidos con los tratamientos enzimáticos aportaron la primera evidencia de que polisacáridos presentes en la pared de *S. sclerotiorum* tendrían un rol importante en la interacción y posterior respuesta de las células de zanahoria al mencionado patógeno. Con el objetivo de aislar y caracterizar el componente activo presente en el EEC se realizó una marcha de purificación.

Fraccionamiento por tamíz molecular

La preparación del *elicitor* liberado de las paredes celulares de *S. sclerotiorum* fue fraccionada en base al tamaño molecular de sus componentes en una columna de Bio-Gel A 0.5 M. En la fig. 11 se muestra el perfil de elución de los polisacáridos correspondientes a una alícuota del EEC.

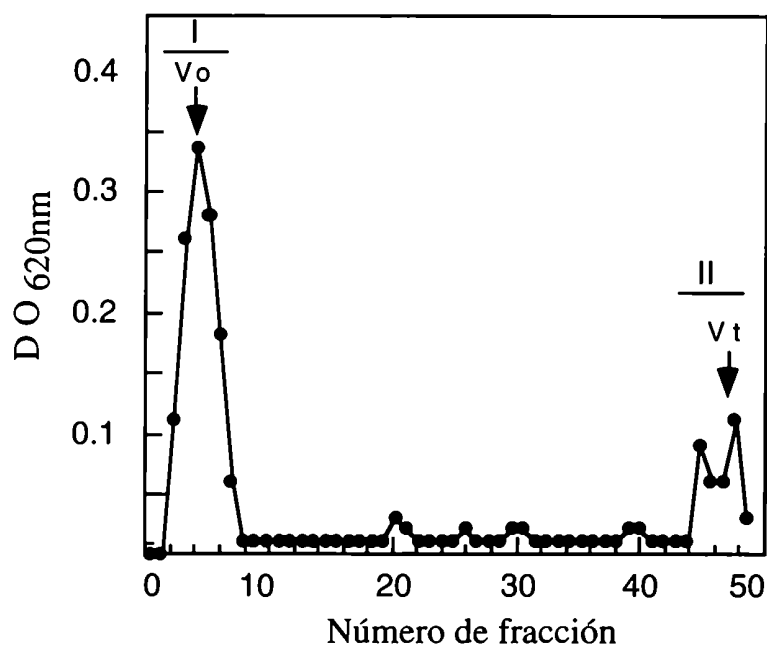


Fig.11: Cromatografía en Bio-Gel A 0.5 M. Una alícuota del EEC proveniente de *S. Sclerotiorum* fue sembrada en una columna de 1 x 75 cm y eluída con acetato de piridina 0.1 M (pH 5.5). Los hidratos de carbono fueron determinados como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS. Vo: volumen de exclusión, Vt: volumen total de la columna.

El material eluído de la columna fue recuperado y reunido en distintas fracciones que fueron utilizadas para medir su capacidad de inducir la PAL en cultivos de zanahoria. En estos ensayos las células de zanahoria fueron incubadas con una alícuota (100 μ g de glucosa equivalentes) de las fracciones que mostraron contener hidratos de carbono (1-10 y 41-50), el resto de las fracciones provenientes de la columna fueron concentradas y agregadas en su totalidad sobre los cultivos. En la tabla 3 se muestran los resultados de la determinación de la actividad de la PAL en extractos citosólicos provenientes de estas células.

TABLA 3: Actividad inductora de la PAL de las fracciones eluídas de la columna de Bio-Gel A 0.5 M

Fracción	Actividad enzimática (PAL) ^a
1-10 (Fracción I)	12.0
11-20	1.9
21-30	1.6
31-40	3.2
41-50 (Fracción II)	7.1
H ₂ O	1.4

a: Los resultados se expresan en μ moles de *t*-cinámico/h/mg proteína

Los datos presentados muestran que la actividad de la PAL co-eluyó con los polisacáridos presentes en las fracciones señaladas como I y II en la fig. 11. Si bien los cultivos de zanahoria inoculados con la fracción II mostraron un aumento de la actividad enzimática con respecto a los controles (H₂O), los resultados obtenidos indicaron que la fracción I tuvo un mayor efecto inductor de la PAL en los cultivos. Además, como puede observarse en la fig. 11, el EEC está compuesto principalmente por polisacáridos de alto PM, ya que el 77% de los hidratos de carbono sembrados en la columna eluyen en la fracción I. En consecuencia se continuó analizando la fracción I.

Fraccionamiento por intercambio iónico

La fracción I (fig. 11) fue sometida a una cromatografía en una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex. En la fig. 12 se muestra el perfil de azúcares y de proteínas medida en cada una de las fracciones.

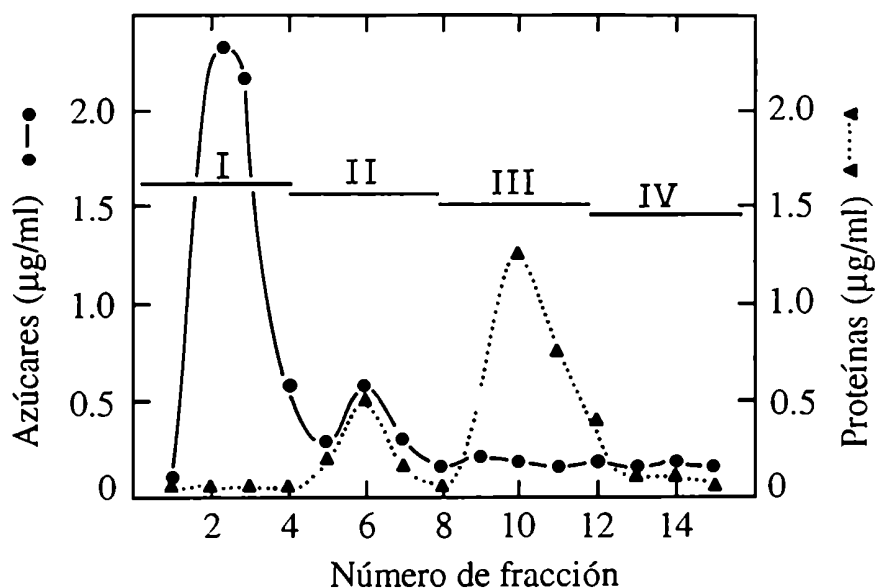


Fig. 12: Fraccionamiento por intercambio iónico. El material eluido de la columna de Bio-Gel A 0.5 M correspondiente al V_0 se concentró y se sembró en una columna de DEAE-Sephadex. Se eluyó utilizando un gradiente discontinuo de NaCl (I: H_2O , II: 50 mM, III: 200 mM, IV: 500 mM NaCl). Se recogieron fracciones de 1.5 ml. Los carbohidratos y las proteínas fueron determinados según se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS.

Las fracciones obtenidas en cada paso de elución de la columna fueron reunidas y sembradas en una columna de Sephadex G-10 para eliminar las sales. Una vez concentradas, se utilizó todo el material reunido para inocular cultivos de zanahoria a los efectos de medir la inducción de la actividad de la PAL. El resultado de este experimento se muestra en la tabla 4.

TABLA 4: Actividad inductora de la PAL de las fracciones eluídas de la columna de DEAE-Sephadex

Fracción	Actividad enzimática (PAL) ^a
I	8.1
II	2.0
III	2.1
IV	2.0
EEC	10.2
H ₂ O	2.1

a: Los resultados se expresan en μ moles de *t*-cinámico/h/mg proteína

Con este paso de purificación fue posible separar los polisacáridos de las proteínas presentes en el extracto *elicitor*. De estos resultados se concluye que la respuesta observada en las células de zanahoria se corresponde con la presencia de polisacáridos neutros de alto peso molecular en el medio de cultivo. Por otra parte, si bien puede observarse que una pequeña proporción de azúcares queda retenida en la columna (eluye con NaCl 50 mM), éstos no fueron sometidos a análisis posteriores debido a que la actividad inductora de la PAL está asociada a la fracción neutra. El análisis cromatográfico en papel con el solvente A de los productos de la hidrólisis total de esta fracción neutra reveló la presencia de dos monosacáridos, presumiblemente glucosa y manosa.

Fraccionamiento por columna de Concanavalina A-Sepharosa

Para discernir si la fracción neutra proveniente de la columna de DEAE estaba compuesta por un solo tipo de molécula (glucomanano) o si, por el contrario, contenía una mezcla de polisacáridos (glucano y manano), se realizó una cromatografía de afinidad en una columna de Con A-Sepharosa, que une oligosacáridos de alta manosa.

Luego de sembrar la muestra, se colectaron y reunieron fracciones correspondientes al percolado y al eluido con α -metilmanósido. El análisis por el método de antrona-sulfúrico reveló la presencia de azúcares en ambas fracciones, guardando una relación 1:1.

Cada una de las fracciones fue sembrada en una columna de Sephadex G-10 para eliminar las sales y el α -metilmanósido. El eluido de estas columnas fue utilizado para ensayar su actividad inductora de la PAL en cultivos de zanahoria. Se utilizaron 100 μ g de glucosa equivalentes de cada polisacárido a ensayar. El resultado de la medición de la actividad enzimática en extractos citosólicos provenientes de estos cultivos se muestra en la tabla 5.

TABLA 5: Actividad inductora de la PAL de las fracciones obtenidas de la columna de Con A-Sepharosa

Fracción	Actividad enzimática (PAL) ^a
Percolado	4.0
Retenido	8.2
EEC	10.1
H ₂ O	1.2

a: Los resultados se expresan en μ moles de *t*-cinámico/h/mg proteína

Como puede observarse en la tabla 5, si bien el efecto inductor del compuesto retenido es mayor, ambos polisacáridos actúan como compuestos *elicitor* al ser incubados con las células de zanahoria.

Marcación *in vivo* de los polisacáridos de pared de *Sclerotinia sclerotiorum*

El análisis cromatográfico de los azúcares obtenidos luego de la hidrólisis ácida total del EEC mostró que estaría compuesto por dos monosacáridos. Para facilitar el análisis estructural de los polisacáridos aislados a través de los pasos de purificación mencionados, los hidratos de carbono de la pared de *S. sclerotiorum* fueron marcados *in vivo* utilizando [14 C]-glucosa como precursor radioactivo. Luego de la ruptura del tejido fúngico, el extracto crudo de pared fue sometido a los mismos pasos de purificación detallados anteriormente. Como se muestra en la fig. 13 A, los extractos crudos de pared obtenidos a partir de micelio marcado con [14 C]-glucosa contienen dos compuestos radioactivos que eluyen en la columna de Bio-Gel A 0.5 M en el volumen de exclusión (V_o) y en el volumen de inclusión (V_i), en concordancia con los productos obtenidos a partir de micelio no radioactivo. Del mismo modo, en la fig. 13 B se muestra el perfil de radioactividad de las fracciones obtenidas por pasaje a través de la columna de DEAE-Sephadex. Puede observarse que la radioactividad co-purifica con las fracciones ricas en hidratos de carbono utilizadas en los ensayos de medición de PAL sobre las células de zanahoria.

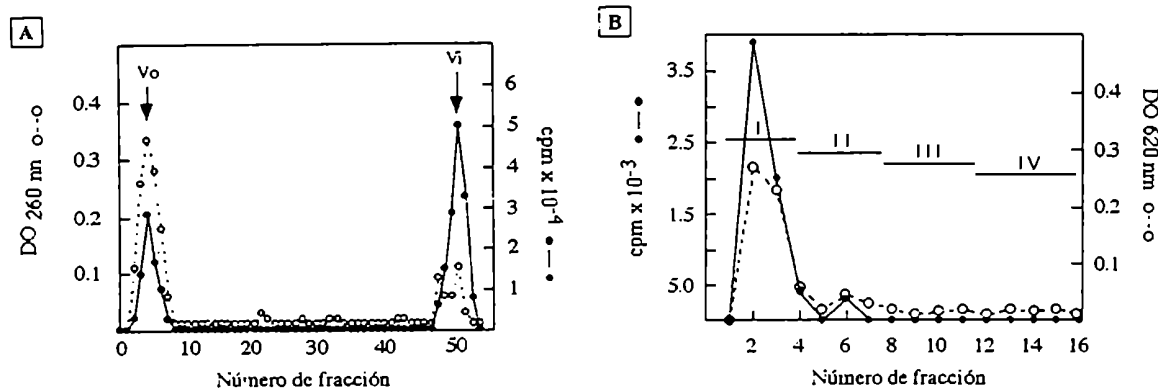


Fig. 13: Purificación del EEC marcado con [14 C]-glucosa. (A) Columna de Bio gel A 0.5 M: una alícuota del EEC marcado con [14 C]-glucosa (●) o del EEC sin marcar (o) fue sembrada en una columna de 1 x 75 cm y eluída con acetato de piridina 0.1 M (pH 5.5). V_o , volumen de exclusión; V_i , volumen de inclusión de la columna. (B) Columna de DEAE-Sephadex: una alícuota del material eluído en el V_o de la columna de Bio gel A 0.5 M radioactivo (●) o frío (o) fue sembrada en una columna de intercambio iónico. Se eluyó utilizando un gradiente discontinuo de NaCl (I: H₂O, II: 50 mM, III: 200 mM, IV: 500 mM NaCl). Se recogieron fracciones de 1.5 ml. Los carbohidratos y las proteínas fueron determinados como se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS.

Cuando los polisacáridos marcados con [^{14}C]-glucosa provenientes de la columna de DEAE-Sephadex fueron sometidos a fraccionamiento en la columna de Con A-Sepharosa, como sucediera con los compuestos no radioactivos, se separaron en dos fracciones que fueron denominadas A (percolado) y B (retenido por la columna y eluido con α -metilmanósido). La cromatografía en fase reversa de los productos de la hidrólisis ácida total mostró un único pico mayoritario para cada una de estas fracciones (fig. 14), que co-eluyeron con los estándares de glucosa (fracción A, fig. 14 B) y manosa (fracción B, fig. 14 A).

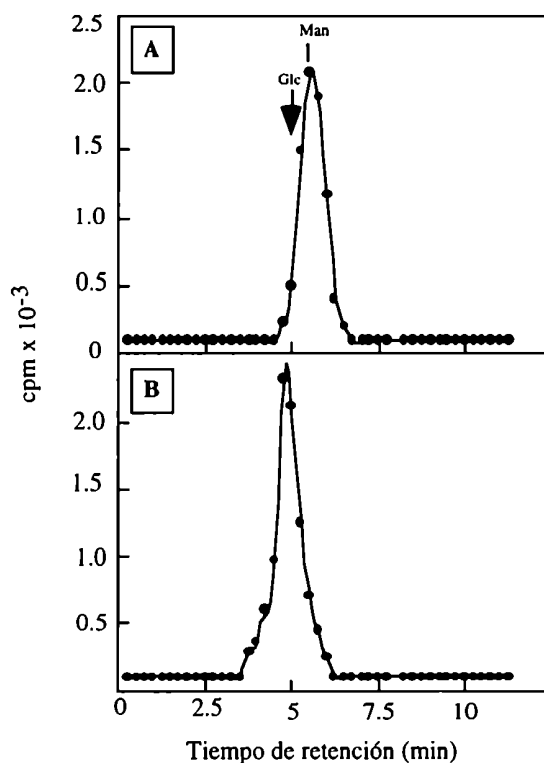


Fig. 14: Cromatografía en Aminex HPX-87C: (A) Perfil de elución de los productos de la hidrólisis ácida total de la fracción B de la columna de Con A-Sepharosa. (B) Perfil de elución de los productos de la hidrólisis ácida total de la fracción A de la columna de Con A-Sepharosa. Glc: glucosa, Man: manosa.

Este resultado fue posteriormente confirmado por la cromatografía descendente en papel de cada uno de los compuestos eluidos de la columna de HPLC (fig. 15 A, paneles 1 y 2) y la subsiguiente electroforesis en papel de cada uno de los picos de radioactividad detectados (fig. 15 B, paneles 1 y 2).

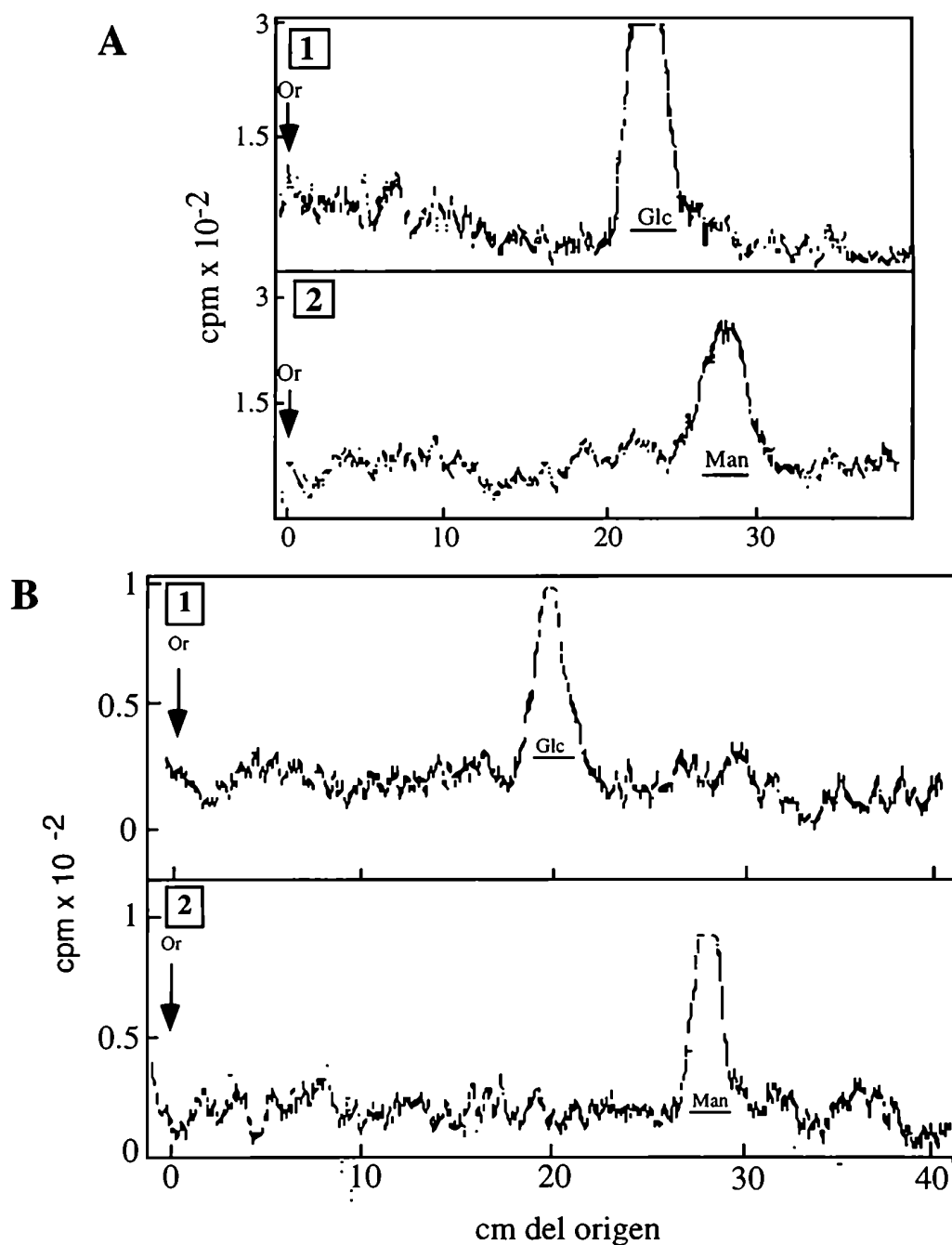


Fig. 15. Cromatografía y electroforesis en papel: Las fracciones correspondientes a cada uno de los picos provenientes de la columna de HPLC (Fig. 14) fueron reunidas, concentradas y sometidas a una cromatografía en papel con el solvente B. (A) *Panel 1:* fracciones que co-eluyeron con Glucosa (Fig. 14, panel B), *panel 2:* fracciones que co-eluyeron con Manosa (Fig. 14, panel A). Los compuestos fueron posteriormente eluidos del papel y sometidos a una electroforesis con el buffer A. (B) *Panel 1:* compuesto proveniente del panel 1 (A), *panel 2:* compuesto proveniente del panel 2 (A). La radioactividad fue detectada con un radiocromatógrafo.

Se consideró a estos datos como evidencia de que la actividad inductora de la PAL en los cultivos de zanahoria reside en polisacáridos de alto peso molecular, glucano y manano, presentes en la pared de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Columna de superosa 6 HR

Los compuestos separados por la columna de Con A-Seaarosa, glucano y manano, fueron sometidos a cromatografía de tamíz molecular utilizando un equipo de FPLC, con el propósito de determinar su masa molecular. En la fig. 16 se observa el perfil de elución de ambos polisacáridos. El análisis del perfil de radioactividad obtenido a partir del glucano (fig. 16, panel A) y del manano (fig. 16, panel B) muestra que en esta columna ambos polisacáridos son resueltos en dos picos mayoritarios. De acuerdo a la calibración de la columna realizada con dextranos de diferente tamaño, la masa molecular estimada para los picos de glucano eluidos a los 30 y 45 min fue de 1,700,000 y 100,000 respectivamente, mientras que los correspondientes al manano, que eluyeron a los 25 y 39 min, fueron estimados en 1,900,000 y 500,000. Es probable que los compuestos que eluyen con mayor tiempo de retención sean productos de degradación de las moléculas de mayor tamaño. Esto podría explicar por lo menos lo observado para el glucano, ya que si ambas especies hubiesen estado presentes en el EEC, debieran haberse resuelto en la cromatografía por tamíz molecular en Bio-Gel A 0.5 M realizada en el primer paso de la purificación.

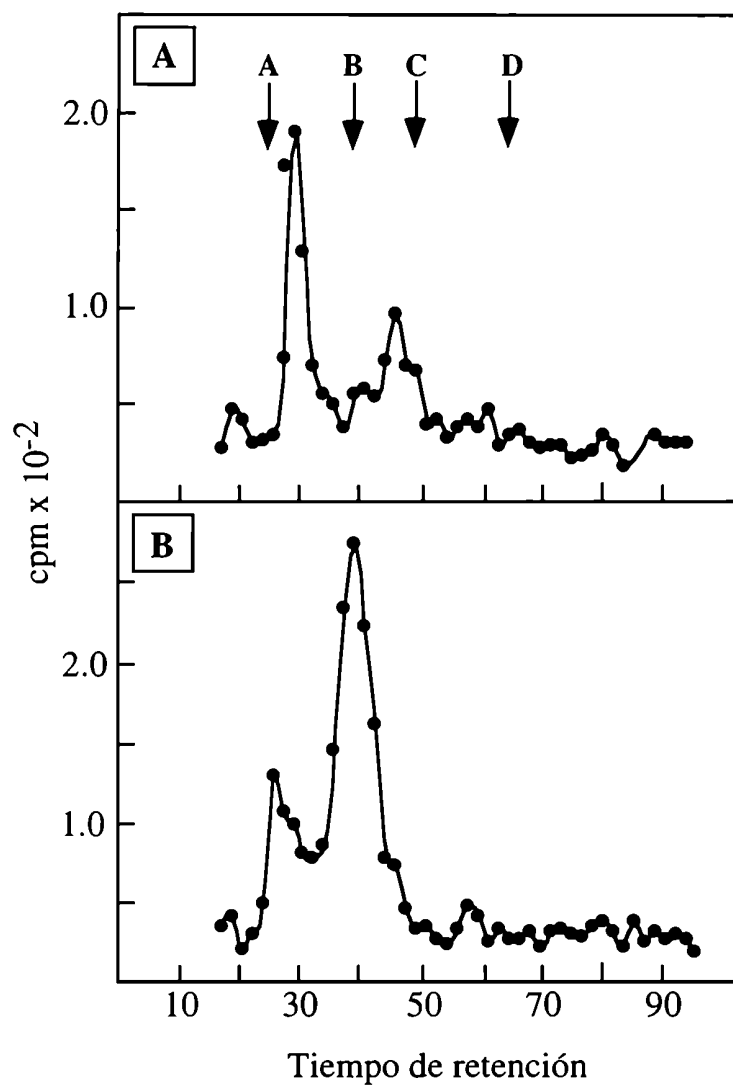


Fig. 16: Cromatografía en Superosa 6 HR. Perfiles obtenidos en las cromatografías en una columna de tamiz molecular del glucano (panel A) y manano (panel B). Las flechas indican los tiempos de retención de los estándares de peso molecular: (A) Dextran 2,000,000; (B) Dextran 500,000; (C) Dextran 70,000; (D) Dextran 10,000.

*Respuesta de los cultivos de zanahoria a incubaciones sucesivas con el EEC de *Sclerotinia sclerotiorum**

Como se muestra en la fig. 9, la actividad de la PAL se estimuló transitoriamente cuando un cultivo de zanahoria de 10 días fue incubado en presencia de extractos crudos de pared de *S. sclerotiorum*, alcanzando un máximo de actividad a las 11 h de incubación y decayendo luego a niveles basales. Si las células incubadas durante 60 h con el extracto elicitor son lavadas, repicadas a medio fresco e incubadas nuevamente por 11 h en presencia de EEC (Fig. 17, D), se observa que las células no son capaces de responder a esta nueva estimulación con el extracto *elicitor* —por lo menos en términos de la inducción de la actividad de la PAL—. Lo observado podría obedecer a una pérdida de la viabilidad de las células. De hecho, si son lavadas y repicadas a medio fresco, estas células muestran un arresto en su crecimiento (medido como aumento en el peso húmedo de tejido).

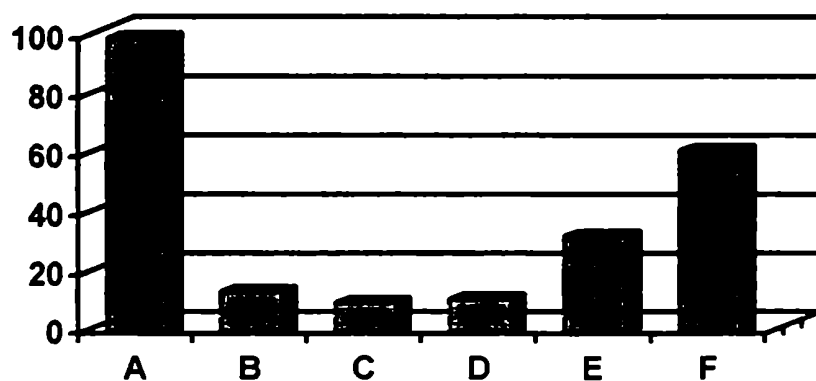


Fig. 17: Actividad porcentual de la PAL: La actividad enzimática fue determinada en extractos citosólicos de células de zanahoria (ZA^+) obtenidos a partir de las siguientes incubaciones: **A**, ZA^+ + EEC, 11 h de incubación; **B**: ZA^+ + EEC, 60 h de incubación; **C**: ZA^+ inducidas por 60 h con EEC + medio nuevo, 11 h de incubación; **D**: ZA^+ inducidas 60 h con EEC + medio nuevo + EEC, 11 h de incubación; **E**: ZA^+ + medio de células inducidas 60 h con EEC, 11 h de incubación; **F**: ZA^+ + medio de células inducidas 60 h con EEC + EEC, 11 h de incubación. En todos los casos se usaron 4 $\mu\text{g/ml}$ de EEC.

Por otra parte, es probable que las células expuestas durante 60 h al EEC hayan liberado al medio algún compuesto inhibitor. Si el sobrenadante de este cultivo es adicionado a otro cultivo de zanahoria, y además se agrega EEC (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), puede observarse que las células presentan solo un 62% de la actividad enzimática medida en un cultivo incubado únicamente con EEC (Fig. 17 F). Si se realiza este mismo experimento, pero ahora sin el agregado de EEC, se observa que la actividad enzimática en este caso se reduce a un 33% (Fig. 17 E); resultado que podría sugerir que además de la presencia de un compuesto inhibitor, el *elicitor* podría estar consumiendo o metabolizándose.

Degradación del EEC por células de zanahoria

Con el propósito de analizar si los polisacáridos presentes en el EEC sufren alguna clase de alteración durante su incubación con las células vegetales, se incubaron cultivos de zanahoria con un producto de purificación parcial del EEC marcado radioactivamente con [^{14}C]-glucosa. La fracción utilizada correspondió al V_0 proveniente de una columna de Bio-Gel A 0.5 M. Paralelamente, otra alícuota de esta fracción fue incubada en el medio de cultivo sin células vegetales. Al cabo de 15 h, los sobrenadantes de los cultivos fueron concentrados y sometidos a una cromatografía de tamíz molecular en una columna de Bio-Gel P4 (Fig. 18).

Como puede observarse, cuando la fracción del EEC fue incubada en presencia de células de zanahoria, el 50% de la radioactividad eluye en el volumen de inclusión de la columna, indicando que algún producto de las células degrada los polisacáridos presentes en el EEC a compuestos de menor peso molecular.

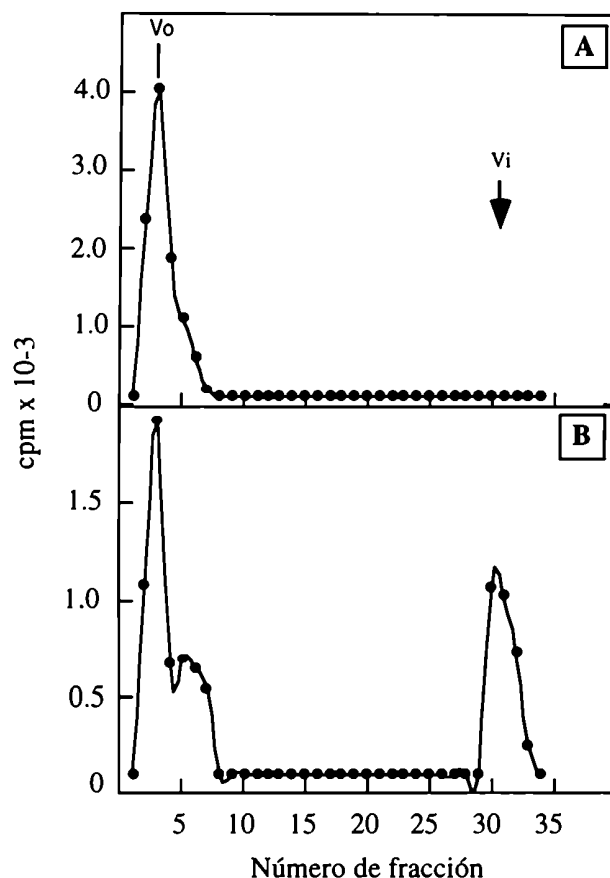


Fig. 18: Degradación del EEC por células de zanahoria. Perfil de radioactividad obtenido luego de una cromatografía en Bio-Gel P 4 del EEC incubado por 15 h en medio de cultivo en ausencia (Panel A) y en presencia (Panel B) de células de zanahoria .

Dado el gran tamaño de las moléculas con "actividad elicitor" de *S. sclerotiorum*, es difícil explicar como puede ser transmitida la señal que finalmente resulta en la inducción de la actividad de la PAL al interior de las células de zanahoria. El presente resultado permite especular acerca de la posibilidad de que las células secreten enzimas que degraden los polisacáridos a moléculas de menor tamaño que puedan atravesar las paredes de las plantas.

De hecho, se comprobó que las células de zanahoria poseen actividad de β -glucosidasa. Si los extractos citosólicos obtenidos a partir de células de zanahoria inducidas y de células no inducidas con EEC durante 15 h (controles) son incubados con un glucano cíclico β -1,3-1,6-¹⁴C]-glucosa proveniente de *Bradyrhizobium Spp.* como sustrato, se observan productos de degradación.

En la fig. 19 se muestra el perfil de radioactividad de los productos de la reacción analizados en una cromatografía descendente en papel. La cromatografía reveló que el extracto citosólico proveniente de las células inducidas no solo promueve la degradación parcial del sustrato, sino que también lo hace a mayores niveles con respecto a lo observado con el extracto citosólico proveniente de células controles. Estos resultados sugieren que la presencia del EEC induce también una actividad de β -glucosidasa en las células de zanahoria. La inducción de enzimas con estas características se observó además a nivel molecular. Como se describirá en el próximo capítulo, a partir de cultivos inducidos con el EEC se aisló un fragmento correspondiente a un mRNA que codificaría para una β -glucanasa

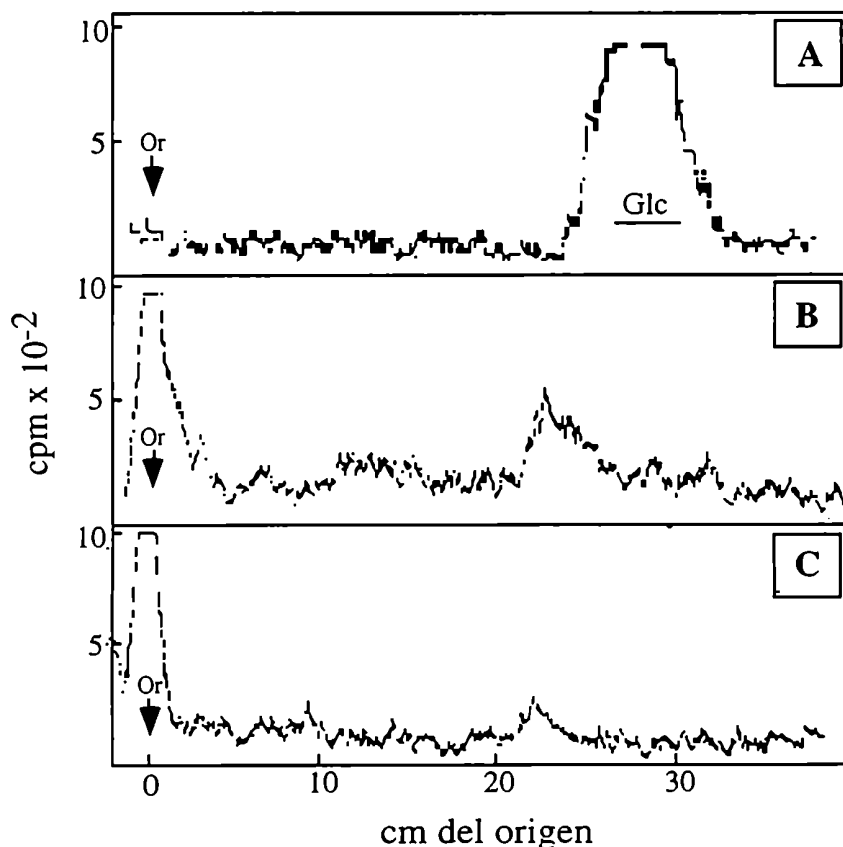


Fig. 19: Cromatografía en papel de los productos obtenidos luego de las incubaciones de extractos citosólicos de zanahoria con glucano β -1,3- β -1,6. Las reacciones fueron incubadas durante 1 h a 37 °C y los productos fueron sometidos a una cromatografía en papel con el buffer B. A) laminarinasa comercial; B) extracto citosólico de células incubadas con EEC; C) extracto citosólico de células controles. Or: origen, Glc: glucosa.

Inducción de la síntesis de compuestos fenólicos en cultivos de zanahoria incubados con extracto crudo de pared de *S. sclerotiorum*

Dado que la actividad de la fenilalanil amonio-liasa se encuentra claramente inducida en cultivos de zanahoria incubados con EEC y que ésta es la primera enzima de la vía metabólica de los fenilpropanoides, se consideró la posibilidad de que la actividad de otras enzimas que actúan más adelante en esta vía metabólica también estuvieran inducidas en estos cultivos. De ocurrir esto, es de esperar una acumulación de los productos de las reacciones de la vía metabólica de los fenilpropanoides en las células inducidas con el EEC.

Para analizar esta posibilidad, se incubaron cultivos de zanahoria con EEC (10 µg/ml). Al cabo de 7 h se dieron pulsos de 5 y 45 min con [¹⁴C]-fenilalanina (2 µCi), procedimiento que se realizó en forma paralela sobre cultivos no inducidos con el EEC. Los compuestos fenólicos obtenidos por extracción metanólica fueron analizados en HPLC (Fig. 20).

Estos resultados indicarían que en las células de zanahoria inducidas con el EEC hay una acumulación progresiva de distintos compuestos fenólicos derivados de la fenilalanina.

Para confirmar la identidad de los compuestos fenólicos, cada uno de los compuestos obtenidos en la columna fueron concentrados y sometidos a cromatografías en papel y TLC (fig. 21 y 22 respectivamente). A partir de la movilidad de los compuestos en estos sistemas cromatográficos se identificaron, además de la fenilalanina, dos compuestos derivados de ésta: los ácidos *trans*-cinámico y cumárico, productos de las reacciones catalizadas por la fenilalanil amonio-liasa y la cumarato 4-hidroxilasa.

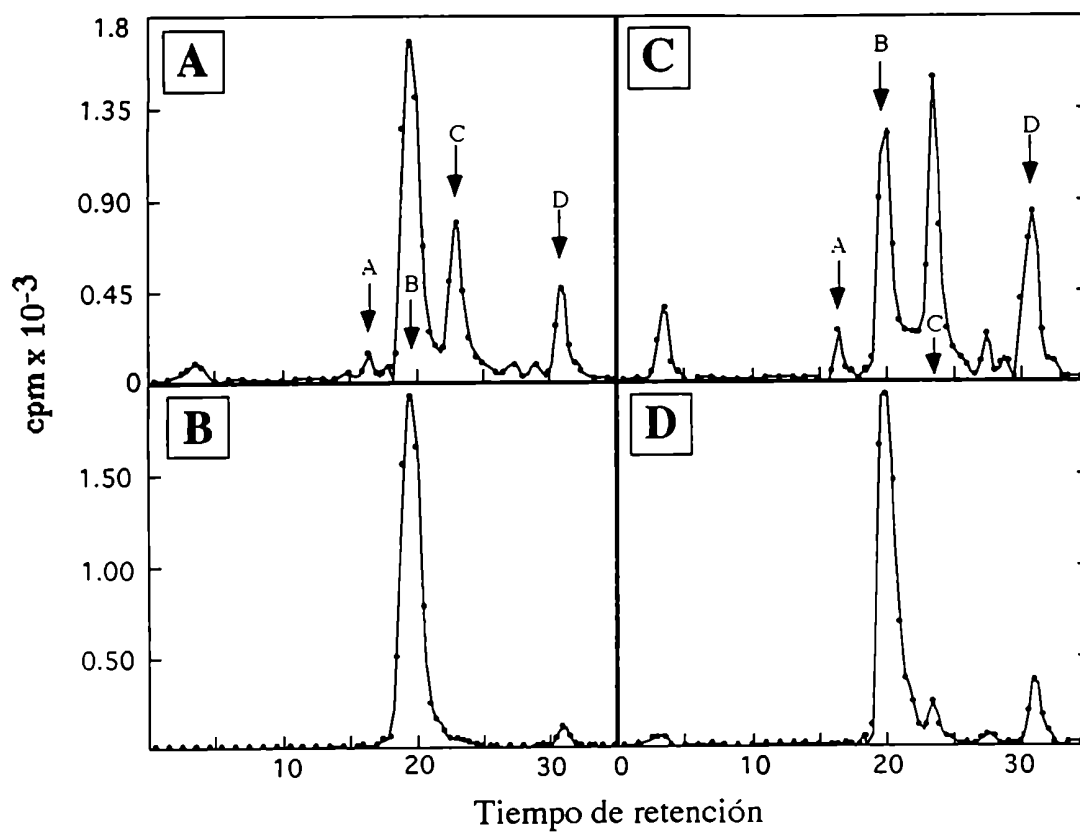


Fig. 20: Cromatografía de compuestos fenólicos provenientes de células de zanahoria en HPLC. Los extractos metanólicos obtenidos a partir de células de zanahoria inducidas con EEC fueron cromatografiados en una columna de C18 luego de un pulso con [¹⁴C]-fenilalanina de 5 min (panel A) y de 45 min (panel C). Los paneles B y D corresponden a extractos metanólicos obtenidos a partir de células no inducidas tratadas como en A y C respectivamente. Estándares: A, ácido hidrocafeico; B, fenilalanina; C, ácido cumárico; D, ácido *trans*-cinámico.

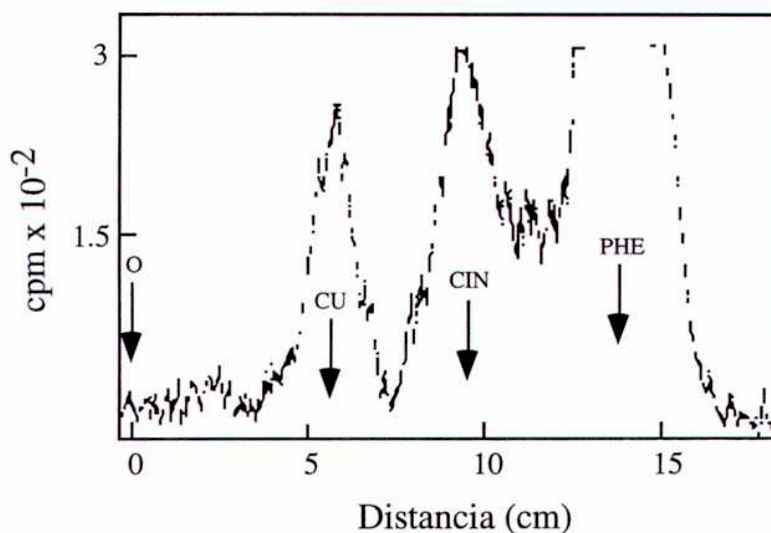


Fig. 21: Cromatografía en papel de los compuestos fenólicos. Los picos señalados como B,C y D en la fig. 20 fueron concentrados y sometidos a una cromatografía en papel en el solvente D (ver MATERIALES Y MÉTODOS). La radioactividad fue detectada con un radiocromatógrafo. O: origen, CU: ácido cumárico, CIN: ácido *trans*-cinámico, PHE: fenilalanina.

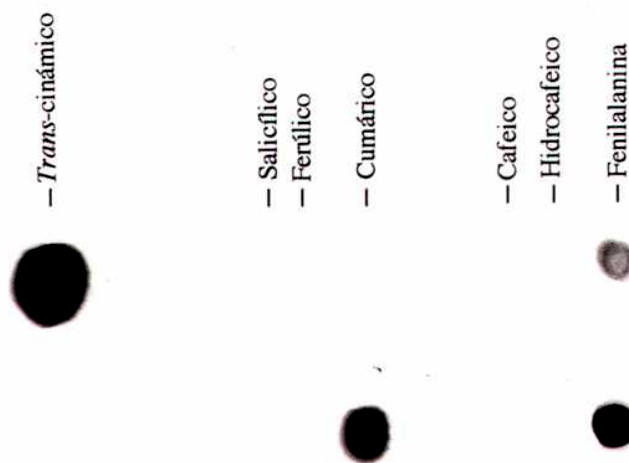


Fig. 22: Autoradiografía de los compuestos fenólicos analizados en TLC: Los picos señalados como B,C y D en la fig. 20 fueron concentrados y sometidos a una cromatografía en placa delgada con el solvente C (ver MATERIALES Y MÉTODOS). Los estándares se señalan a la derecha. Origen: fenilalanina.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios llevados a cabo en cultivos celulares en suspensión han demostrado que los productos de excreción de algunos hongos fitopatógenos o fragmentos de sus paredes celulares estimulan la actividad de las enzimas del metabolismo de los fenilpropanoides, la síntesis de fitoalexinas y otros compuestos relacionados con la defensa (Cote y Hahn, 1994). La fenilalanil amonio-liasa (PAL) es una enzima clave del metabolismo secundario de las plantas. El producto de la reacción que cataliza —ácido *trans*-cinámico— es el precursor de una gran variedad de compuestos que poseen un esqueleto de fenilpropano (Camm y Towers, 1973). Se ha observado que la expresión del gen de la PAL aumenta marcadamente como consecuencia de la luz (Hahlbrock y Grisebach, 1979), el daño mecánico (Bowles, 1990) y los cambios hormonales (Haddon y Northcote, 1976), así como también en respuesta a infecciones generadas por microorganismos fitopatógenos, por lo que la inducción de su actividad enzimática es considerada como marcador de respuestas de defensa de las plantas.

En zanahoria, Kurosaki y col. (1986) demostraron que la actividad de la PAL y de una quitinasa se inducía en cultivos celulares incubados con un *elicitor* proveniente del hongo *Chaetomiun globosum*. Para poder estudiar los mecanismos moleculares de la interacción entre *Sclerotinia sclerotiorum* y huéspedes susceptibles se estableció en primer lugar si un cultivo en suspensión de células de zanahoria también podía ser utilizado como modelo para medir respuestas de defensa en relación a *S. sclerotiorum*.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que un *elicitor* obtenido a partir de la pared del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* tiene la propiedad de cambiar el metabolismo de las células de cultivos en suspensión de zanahoria, resultando en la estimulación de la actividad de al menos una de las enzimas involucradas en el metabolismo de fenilpropanoides, la fenilalanil amonio-liasa.

El primer efecto apreciable visiblemente en los cultivos fue un oscurecimiento progresivo de las células a partir del agregado del EEC al medio de cultivo (Fig. 6). Esta reacción, descrita también en cultivos de papa inoculados con un *elicitor* de *Phytophthora infestans*, ha sido asociada a la acumulación de compuestos fenólicos y a la inducción de la expresión de los correspondientes mRNAs. Si bien las respuestas de defensa de las plantas son complejas y es difícil definir el grado de participación de cada componente en la expresión de la resistencia, se ha postulado que los compuestos fenólicos tendrían un rol importante en la limitación de las infecciones. En plantas de tabaco transformadas con un RNA anti-sentido de la PAL que sintetizan niveles inferiores de compuestos fenólicos con respecto a las salvajes, las lesiones

producidas por el patógeno *Cercospora nicotianae* son considerablemente mayores (Dixon y Paiva, 1995).

Así como en las interacciones incompatibles entre las plantas y los microorganismos fitopatógenos se ha demostrado una correlación entre la acumulación de compuestos fenólicos, fitoalexinas e inducción de los correspondientes mRNAs con la resistencia a infecciones, en las interacciones compatibles también se detecta la inducción de esta clase de moléculas, aunque en estos casos la respuesta aparece más tardíamente. Por ejemplo, en plantas de poroto resistentes a *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* la inducción de la expresión de los mRNAs asociados a la defensa alcanza un pico a las 4 h post-inoculación; en cambio, si la planta es inoculada con el hongo patógeno *F. solani* f. sp. *pisi*, la respuesta aparece a las 10 h post-inoculación (Hadwiger y Culley, 1993). De manera análoga, Mahe y col. (1993) demostraron que en una interacción incompatible entre *C. lindemuthianum* y poroto la acumulación del mRNA de la PAL aparece 32 h antes que en la interacción compatible.

En relación a *Sclerotinia sclerotiorum*, Bazzalo encontró que plantas de girasol tolerantes a la infección acumulaban mayores cantidades de ácido clorogénico (Bazzalo *et al.*, 1985). En zanahoria, como se muestra en la fig. 21, si se realiza un pulso con [¹⁴C]-Fenilalanina en cultivos incubados durante 7 h con el EEC, se observa una acumulación progresiva de compuestos radioactivos extraíbles con metanol. De éstos, dos fueron caracterizados como ácido *trans*-cinámico y ácido cumárico, productos de las reacciones catalizadas por la PAL y la C4-H (cinamato 4-hidroxilasa), 1^º y 2^º enzimas de la vía de los fenilpropanoides respectivamente. Dado que la interacción que se establece entre *S. sclerotiorum* y las plantas hospedadoras es básicamente compatible —hasta el presente no se han hallado líneas o variedades totalmente resistentes— se podría especular que *in vivo* la velocidad de aparición de los compuestos fenólicos no es suficiente para limitar la infección, aunque no puede descartarse la posibilidad de que el hongo posea la capacidad de eludir esta barrera de defensa.

Paralelamente al oscurecimiento de las células, luego del agregado del EEC se observa un detenimiento en el crecimiento de los cultivos (medido como incremento en el peso húmedo). Este fenómeno también fue observado por Ebel en cultivos de soja incubados con un elicitor obtenido de *Phytophthora megasperma* (Ebel *et al.*, 1976).

Mientras que la actividad de la PAL es muy baja en los cultivos en suspensión de zanahoria (0.5-1.5 μ moles *t*-cin./h/mg proteína), la misma se incrementa en el orden de 10-15 veces como resultado de la incubación con el EEC de *S. sclerotiorum*. La máxima estimulación de la actividad enzimática se observa en cultivos de alrededor de 10 días, período que coincide con el comienzo de la fase exponencial de crecimiento. El nivel de inducción de la PAL mostró ser

dependiente de la cantidad de EEC agregado. La máxima actividad enzimática fue obtenida con el agregado de 10 $\mu\text{g/ml}$ de EEC al medio de cultivo (medido como glucosa equivalentes). El efecto fue solo ligeramente menor utilizando 5 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados son similares a los observados en cultivos de soja y poroto, en los que el agregado de 10 $\mu\text{g/ml}$ de un *elicitor* de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de un *elicitor* de *Colletotrichum lindemuthianum* a los respectivos cultivos, condujo a un incremento del orden de 10 a 20 veces en la actividad de la PAL (Ayers *et al.*, 1976; Dixon y Lamb, 1979; Hahlbrock *et al.*, 1981; Cramer, 1985).

Por otra parte, las células de zanahorias incubadas con el EEC presentan cambios en el patrón de expresión de proteínas (fig.7), dando la pauta de que el mismo induce importantes alteraciones a nivel molecular.

Estos resultados indicaron que algún componente presente en la pared de *Sclerotinia sclerotiorum* es reconocido por las células de zanahoria y, de manera análoga a lo descrito para otras interacciones planta-patógeno, actúa como un *elicitor*. Para determinar su naturaleza química, el EEC fue sometido a tratamientos enzimáticos y distintos pasos de purificación. En cada etapa la actividad *elicitor* fue evaluada tomando como referencia el incremento de la actividad de la PAL en los cultivos de zanahoria.

La estabilidad del EEC frente al tratamiento térmico (1 h a 120 °C) y al tratamiento con proteasas, sumado al hecho de que la digestión del EEC con glucosidasa (conjunto de glicosidasas) destruye su "actividad *elicitor*", sugirió que los componentes con actividad "elicitor" serían polisacáridos.

Los carbohidratos presentes en el EEC se separaron en base a su tamaño en dos fracciones denominadas I y II (Fig. 10). Si bien la "actividad *elicitor*" co-eluyó con ambas fracciones, el 77% de los hidratos de carbono sembrados correspondió a la fracción I. Por otra parte, la actividad inductora de la fracción I mostró ser aproximadamente el doble que la de la fracción II. Los análisis preliminares (datos no mostrados) de los hidratos de carbonos presentes en la fracción II por fraccionamiento en columnas de Bio-Gel P2 mostraron que estaba compuesta fundamentalmente por mono, di y trisacáridos que en ensayos sobre cultivos de zanahoria mostraron no poseer "actividad *elicitor*". Debido a que la fracción II eluye en el volumen de inclusión de la columna de Bio-Gel A 0.5 M, es probable que se encuentre impurificada con otras moléculas de PM menor a 10,000 que contribuyan a la inducción de la actividad de la PAL. Futuros análisis son necesarios para aclarar la "actividad *elicitor*" observada en esta fracción.

La utilización de la columna de DEAE-Sephadex permitió obtener una fracción de polisacáridos libres de proteínas, que retuvo la "actividad *elicitor*". Finalmente, mediante el pasaje de esta fracción por una columna de afinidad (Con A-Sepharosa) se separaron dos compuestos en

cantidades equivalentes, uno de los cuales quedó retenido por la columna y fue eluido con α -metil manósido.

Por hidrólisis ácida total del compuesto no retenido por la columna se obtuvo que el mismo está compuesto solo por glucosas, mientras que el compuesto retenido contiene solo manosas. Mediante la marcación *in vivo* de las paredes fúngicas con precursores radioactivos ($[^{14}\text{C}]$ -glucosa) se confirmó posteriormente que estos compuestos con "actividad elicitor" eran un glucano y un manano.

Desde que se demostró que una molécula de carbohidrato de la superficie de la membrana de los eritrocitos era esencial para la adherencia y entrada del virus de la influenza (Burnet, 1951), los glicanos han sido involucrados en un amplio espectro de procesos de reconocimiento. Desde hace aproximadamente 15 años se han estado estudiando los roles de los oligosacáridos en el proceso de reconocimiento entre las plantas y los microorganismos fitopatógenos. Se han identificado varios tipos de oligosacáridos derivados de las paredes fúngicas que inducen respuestas de defensa en los tejidos vegetales (Darvill y Albersheim, 1984; Ryan, 1988). Los primeros en ser caracterizados fueron β -glucanos. Se determinó que un heptasacárido compuesto por unidades de glucosa con uniones β -1,6 y β -1,3 aislado a partir hidrolizados de la pared celular de *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, es uno de los más potentes inductores de fitoalexinas caracterizados (Côte *et al.*, 1995). Otros polímeros aislados a partir de las paredes celulares de numerosos hongos que presentan la propiedad de inducir respuestas de defensa en las plantas son los quitosanos (β -1,4-glucosamina) y las quitinas (β -1,4-N-acetilglucosamina). De modo análogo a lo descrito en otras interacciones entre hongos y plantas, tanto el glucano como el manano de las paredes de *S. sclerotiorum* actúan como *elicitors* sobre los cultivos de zanahoria.

Se ha descrito que las paredes de *S. sclerotiorum* están compuestas en un 80% por β -1,3-1,6-glucano (Jones, 1970). Estudios preliminares indicaron que el elicitor aislado tendría uniones de tipo 1,3, aunque es necesario continuar la caracterización del mismo para determinar su estructura.

A diferencia de los glucanos, prácticamente no se han descrito *elicitors* compuestos por unidades de manosa. Por tratamiento con β -1,3-glucanasas de soja se extrajeron glucomanos a partir de las paredes de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Este polisacárido, a pesar de constituir solo el 5.5% de la pared celular del hongo, resultó ser alrededor de 10 veces más activo que un β -glucano aislado a partir del mismo hongo (Keen y Yoshikawa, 1983; Keen *et al.*, 1983). En consecuencia, el manano aislado a partir de la pared de *Sclerotinia sclerotiorum*

descrito en esta tesis representaría el primer *elicitor* con la particularidad de estar constituido solo por manosas.

Se ha descrito que los glucanos de masa molecular mayor a 6,500 no pueden atravesar las paredes celulares de las plantas (Carpita et al., 1979), sin embargo los polisacáridos aislados a partir de la pared de *S. sclerotiorum* tienen una masa molecular superior a 1,000,000 (fig. 16). Esto sugiere que la presencia de glicosidasas que puedan degradar estas moléculas a fragmentos de menor tamaño, permitiendo el acceso de las mismas a los receptores de las membranas celulares, podría resultar ventajosa en las plantas. En la fig. 18 se muestra que un fenómeno de esta naturaleza podría estar ocurriendo en las células de zanahoria. Cuando se incuban cultivos de zanahoria con los polisacáridos marcados con [¹⁴C]-glucosa de la fracción I provenientes de la Bio-gel A 0.5 M y a las 11 h se analiza en una columna de Bio-gel P4 el tamaño de los polisacáridos, se observa que éstos sufrieron una degradación parcial. De hecho, se observó que las células de zanahoria poseen por lo menos glicosidasas con la propiedad de degradar glucanos como el aislado a partir de *B. japonicum* (fig.19) que presenta uniones de tipo β -1,3-1,6, características comunes al glucano descrito por Jones (1970) como componente principal de la pared de *S. sclerotiorum*.

Los resultados mostrados en la fig. 17 señalan que cuando una fracción del EEC, que ha sido incubada con células de zanahoria, es recuperada y agregada sobre otro cultivo, la "actividad elicitor" se reduce al 33% con respecto a la original. Aunque no puede descartarse la presencia de inhibidores secretados por las células al medio de cultivo, se podría especular que la mayor parte del *elicitor* haya sido degradado a moléculas muy pequeñas carentes de "actividad elicitor", dado el prolongado tiempo de exposición del elicitor (60 h) con las células de zanahoria.

Además, como se describirá en el capítulo 3, se aisló un fragmento de cDNA que correspondería al gen de una β -glucanasa inducible a partir de células de zanahoria incubadas con el EEC.

Tomados en conjunto, estos resultados hacen pensar que la actividad *elicitor* residiría en última instancia en productos de degradación enzimática parcial del glucano y el manano aislados a partir de las paredes de *S. sclerotiorum*. Por tal motivo, sería necesario llevar a cabo experimentos tendientes a determinar el tamaño mínimo y la estructura de los oligosacáridos con actividad *elicitor*. Esto permitirá analizar posteriormente el mecanismo de reconocimiento y transducción de señales en el proceso de infección de los vegetales con *Sclerotinia sclerotiorum*.

CAPITULO 3

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA
INTERACCIÓN
SCLEROTINIA SCLEROTIORUM-DAUCUS CAROTA

ANTECEDENTES

Como se mencionara en la introducción, los recientes avances en el campo de la biología molecular vegetal han permitido revelar algunos aspectos de la naturaleza de las interacciones entre las plantas y los microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, dado el grado de complejidad que implica el análisis de los múltiples factores que las gobiernan, para la mayoría de las interacciones planta-patógeno es aún difícil establecer las causas finales que determinan el grado de compatibilidad o incompatibilidad de una interacción.

La búsqueda sistemática de genes vegetales cuya expresión se induce o reprime en respuesta a una infección por un microorganismo patógeno, es una alternativa válida que permitirá profundizar el conocimiento básico acerca de los mecanismos de resistencia a infecciones.

Por otra parte, el mejoramiento de las prácticas de agricultura y de cosecha, sumado al uso de métodos convencionales de mejoramiento de variedades, ha conducido a la obtención de plantas más tolerantes a condiciones de stress ambiental e infecciones. No obstante, la actual disponibilidad de técnicas moleculares ofrece la posibilidad de obtener plantas mejoradas a un ritmo acorde con la creciente demanda de aumentar la eficiencia de las cosechas. En este sentido, la identificación y el clonado de genes asociados a las reacciones de defensa constituye una importante herramienta a la hora de desarrollar nuevas estrategias que posibiliten la obtención de plantas resistentes a infecciones.

Los métodos empleados para determinar la expresión de genes en estudios comparativos son la electroforesis bi-dimensional de proteínas (O'Farrel, 1975) y la hibridación substractiva (Lee *et al.*, 1991). La primera técnica tiene la desventaja de ser muy costosa y demandar mucho tiempo, ya que es necesario identificar las bandas de interés, secuenciar los péptidos obtenidos por digestiones específicas, hacer PCRs con primers degenerados para finalmente clonar el o los genes correspondientes. La segunda, a pesar de haber sido utilizada con éxito para aislar genes de importancia (Steeg *et al.*, 1988; Basset *et al.*, 1990), es de difícil ejecución, a menudo es irreproducible y requiere grandes cantidades de RNA (Liang *et al.*, 1993). En consecuencia, para analizar la expresión diferencial de genes en cultivos de zanahoria expuestos a extractos de pared de *Sclerotinia sclerotiorum* se optó por hacer uso de una técnica alternativa, denominada «mRNA differential display», descrita recientemente por Liang y Pardee (1992). En este capítulo se describe el clonado de un gen de zanahoria cuya expresión es inducida en respuesta a un *elicitor* de *S. sclerotiorum*, así como también la identificación de otros genes inducibles.

Análisis de la expresión diferencial de genes en células de zanahoria incubadas con EEC proveniente de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Con el objetivo de identificar genes de zanahoria cuya expresión se induzca o reprima en respuesta al EEC fúngico se utilizó el método de «differential display». La estrategia está basada en amplificar secuencias parciales de cDNA a partir de subpoblaciones de mRNAs mediante transcripción reversa y PCR. Para la reacción de síntesis del cDNA, se utiliza un *primer* que consiste en un oligonucleótido de 11 o 12 timidinas, más 2 bases adicionales en el extremo 3' que proveen especificidad. Por probabilidad, este primer reconocerá la doceava parte del total de la población de mRNAs, ya que son posibles 12 diferentes combinaciones de las últimas dos bases del extremo 3' si se omite la T como penúltima base. Este *primer* es luego utilizado en combinación con otro oligodeoxinucleótido de 10 bases de secuencia arbitraria para llevar a cabo las reacciones de PCR. Para un *primer* de secuencia arbitraria, las posiciones de «annealing» al cDNA estarán distribuidas al azar a distintas distancias del extremo 3' del mRNA. En consecuencia, los productos de amplificación de varias moléculas diferentes de mRNA diferirán en su tamaño y, en base a esta característica, podrán ser separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Aislamiento del RNA

En diversos sistemas se ha demostrado que a las 2 horas de agregado un *elicitor* sobre un cultivo de células vegetales, comienza a detectarse claramente un cambio en el patrón de expresión de genes (Lawton y Lamb, 1987; Brady *et al.*, 1993; Logemann *et al.*, 1995). La elección de un tiempo de incubación adecuado para analizar cambios en los niveles de expresión de genes de zanahoria expuestos al EEC de *Sclerotinia sclerotiorum* se realizó tomando en consideración estos antecedentes y los resultados de inducción de la actividad de la PAL mostrados en la figura 9. Se optó por incubar a los cultivos de zanahoria durante 7 horas en presencia del EEC (10 µg/ml) de *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que, si bien es un período arbitrario, es razonable pensar que transcurrido ese lapso las células presentan una intensa actividad metabólica.

En la fig. 23 se muestra el RNA extraído a partir de cultivos incubados en paralelo en presencia (inducido) y ausencia (control) de EEC de *S. sclerotiorum*. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con DNAsa libre de RNAsa para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico.

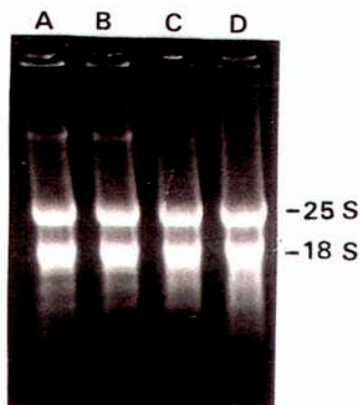


Fig. 23: Aislamiento de RNA. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% teñido con bromuro de etidio del RNA aislado a partir de cultivos de zanahoria inducidos con EEC (calles B y D) y no inducidos (calles A y C), tratados (calles C y D) y no tratados (calles A y B) con DNAsa.

Síntesis del cDNA y reacción de differential display

Con el RNA obtenido se llevaron a cabo reacciones de síntesis de cDNA utilizando como *primer* el oligodeoxinucleótido 5'-T₁₁GC-3'. Seguidamente se realizó la reacción de PCR con el *primer* mencionado y otro de secuencia arbitraria de 10 bases (OL 5: 5'-CGGCCCTGT-3'). En la fig. 24 se muestra la autoradiografía de los productos de la reacción de amplificación.

Si en la reacción de síntesis del cDNA se omite el agregado de transcriptasa reversa, se obtiene un resultado similar al observado en el panel A (calle 1) y panel B (calle 3) de la fig. 24, descartando la posibilidad de que los productos de amplificación se hubiesen generado a partir de DNA genómico contaminante.

En la misma figura se muestra que si el mismo procedimiento se lleva a cabo con el *primer* 5'-T₁₁CA-3' y el mismo OL 5 (Fig. 24 B), es posible obtener un patrón completamente diferente de fragmentos amplificados. Este resultado confirma que los productos de amplificación provienen de distintas subpoblaciones de mRNA, y que utilizando distintos juegos de *primers*, la técnica empleada permite la detección de numerosos mRNAs diferencialmente expresados.

En la fig. 25 se muestra la autoradiografía de otra reacción de «differential display». En este caso, los *primers* utilizados fueron 5'-T₁₁NG-3' y OPZ 7 (5'-CCAGGAGGAC-3').

Como puede observarse en la fig. 24 A, tres productos de amplificación de aproximadamente 300, 200 y 120 bases claramente diferencian a las células inducidas de las controles. De manera análoga, en la figura 25 se detectan dos bandas —de aproximadamente 400 y 300 pb— que están presentes en la calle correspondiente a los productos de amplificación del cDNA sintetizado a partir de RNA proveniente de células de zanahoria inducidas con el EEC, que no se detectan en la calle correspondiente a la misma reacción llevada a cabo con material obtenido a partir de células no inducidas.

Estas bandas, que representarían probables mRNAs cuya síntesis es inducida por el EEC de *S. sclerotiorum*, fueron eluidas del gel como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS, y sometidas a una nueva ronda de amplificación utilizando el mismo conjunto de *primers* empleados en la reacción de «differential display». En este paso, los productos de la reacción de PCR pueden visualizarse en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, posibilitando además obtener la suficiente cantidad de moléculas para su clonado y secuenciación.

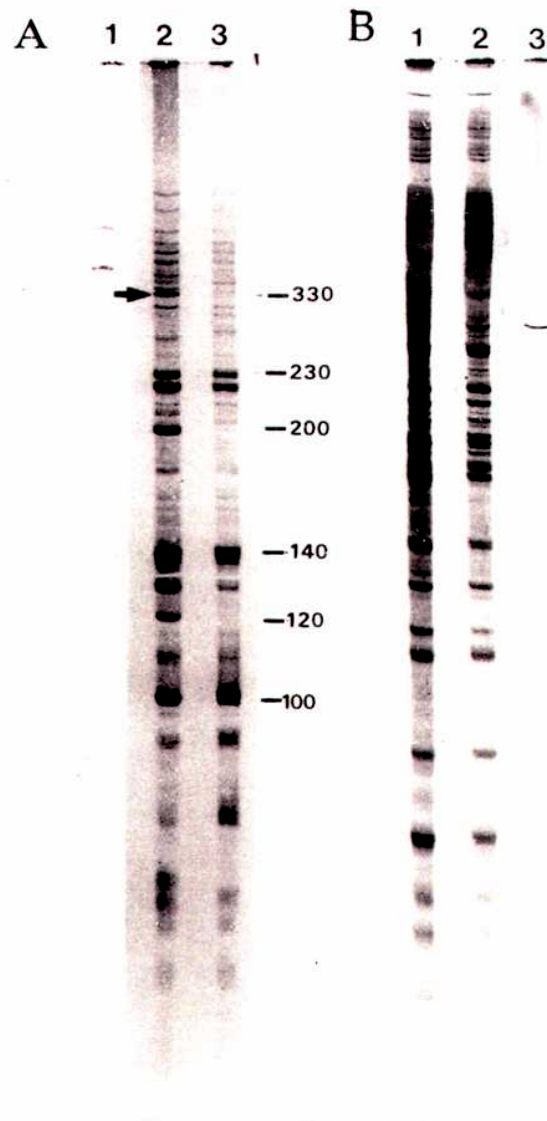


Fig. 24: Autoradiografía de los productos de la reacción de «differential display». Se extrajo RNA total a partir de células no inducidas o inducidas por 7 h con EEC según se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS. La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo utilizando el primer T₁₁GC (panel A) y T₁₁CA (panel B). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo sobre cDNA, utilizando el primer OL 5 junto a los mismos primers usados para la síntesis del cDNA. Panel A: calle 1, blanco (se omitió el cDNA en la reacción); calle 2: cDNA de células inducidas con EEC; calle 3, cDNA de células controles sin inducir. Panel B: calle 1, cDNA de células inducidas con EEC; calle 2, cDNA de células controles sin inducir, calle 3, blanco.

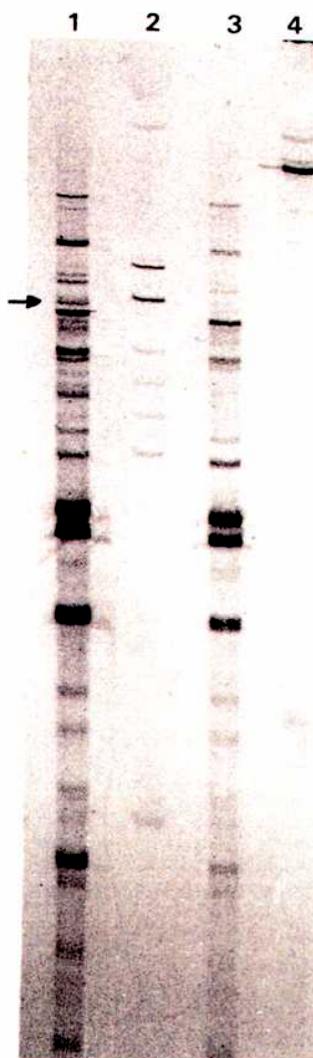


Fig. 25: Autoradiografía de los productos de la reacción de «differential display». Se extrajo RNA total a partir de células no inducidas o inducidas por 7 h con EEC según se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS. La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo utilizando el primer T₁₁NG. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo sobre cDNA, utilizando el primer OPZ 7 junto al mismo primer usado para la síntesis del cDNA. Calle 1, blanco de células inducidas con el EEC (se omitió la transcriptasa reversa en la reacción de síntesis de cDNA); calle 2: cDNA de células inducidas con EEC; calle 3, cDNA de células controles sin inducir; calle 4, blanco de células controles sin inducir (se omitió la transcriptasa reversa en la reacción de síntesis de cDNA).

Clonado y secuenciación de los fragmentos amplificados

Las bandas de 300 y 200 bases eluidas a partir del gel de la fig. 24 fueron clonadas en el vector pGEM-T. De cada una de las transformaciones, se seleccionaron 10 clones positivos que fueron posteriormente secuenciados.

Con respecto al fragmento de 200 bases, de los 10 clones analizados, 5 mostraron contener la misma secuencia, que fue seleccionada como representativa de la banda eluida (clon 62). Resultados semejantes fueron obtenidos al analizar la secuencia de los 10 clones correspondientes a la banda de 300 pb. De estos últimos, 7 mostraron contener el mismo fragmento (clon 14).

La disparidad de las secuencias analizadas se debe a que el gel no permite resolver los fragmentos amplificados con la eficiencia necesaria como para eluir una única banda, además no se puede descartar la posibilidad de que se haya amplificado más de un fragmento del mismo tamaño.

Como puede observarse en la fig. 26 (panel A), el pCB62 contiene un inserto de 200 pb, con una señal de poliadenilación y un marco de lectura abierto de 34 aminoácidos. Esta secuencia no mostró una homología significativa con las registradas en el GENE BANK.

Por otra parte, el pCB 14 mostró contener un inserto de 307 pb (fig.26, panel B), con dos secuencias señales consenso de poliadenilación situadas a 14 y 22 bases "upstream" del extremo 3' del mRNA y un marco de lectura abierto de 56 aminoácidos. Una región rica en bases GT que actuaría como "enhancer" de la poliadenilación (Wu *et al.*, 1995), fue encontrada 20 pb "upstream" de la señal de poliadenilación.

Al momento de la obtención de la secuencia de este clon, no se encontró homología con ninguna de las registradas en el GENE BANK.

Se clonó además la banda de 400 pb eluida a partir del gel de la fig. 25. De 6 clones analizados, 5 mostraron contener la secuencia de 382 pb que se muestra en la fig. 26 C (clon CB 19). Como puede observarse a partir de la secuencia, el fragmento contiene el primer OPZ 7 flanqueando ambos extremos, una marco de lectura abierto de 62 aminoácidos y una putativa señal de poliadenilación. Esta secuencia no mostró una homología significativa con las registradas en el banco de datos en el momento de su obtención en 1995; sin embargo, una nueva búsqueda realizada recientemente reveló que el fragmento comprendido desde la posición 7 a la 162 de la secuencia nucleotídica tiene un 73% de identidad y un 82% de homología con el fragmento carboxi-terminal de la β -D glucano exohidrolasa de *Hordeum vulgare* (Hrmova *et al.*, 1996).

En la fig. 27 se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del pCB 19 y del extremo carboxi-terminal de la glucanasa de cebada. Dado el grado de identidad encontrado, es altamente probable que el fragmento contenido en el pCB 19 corresponda a una glucanasa de zanahoria.

Ante la alternativa de seleccionar uno de los clones para futuros análisis, se decidió optar por el clon CB14 debido a que se consideró que podría tratarse de un gen no descrito, que abarcaba el ORF de mayor longitud que el contenido en el clon CB62 y que, a diferencia del fragmento contenido en el pCB19, la presencia del poli (A) reforzaba las evidencias de que el fragmento correspondía al extremo 3' terminal de un mRNA.

A

CG GCC CCT GTA TAC ATA GCG TTT CTG CGG TTC ATG GGT GAG GAG GCT GAT
 A P V Y I A F L R F M G E E A D

GCT CCC AAT TAC TTA ATT TAT TCG GAG GCT GGG ATA ATA AAT TTA TGT TTG
 A P N Y L I Y S E A G I I N L C L

TGA TGACATAAACAGAACTATTTCTAAATAATTGTAAACAGAACTATTTCTGCAAATAGGTAA
 * *

CCTCTACTATTTTCGTTTGTGGCAAAAAAAAAAAA

B

C GGC CCC TGT GAA AAT CCT GCA GAG TAC ATA AAC TAC GAA GGC CAA
 G P C E N P A E Y I N Y E G Q

ACG TAC ACT CAG GCA GCT GAT CAA ATT ACT TTT AAC AAG ATT TCT ACG
 T Y T Q A A D Q I T F N K I S T

GGA GAA TTG TCC GAT CCA CCT AAT TCA CTC AAA ACG GCT TGC CCC AAA
 G E L S D P P N S L K T A C P K

TTG TCA TTA CCT CGT GTC AGT GAC ATA TGA GCTATTTTATGTATTATGGTCCG
 L S L P R V S D I *

TATTTTTTTGAGCTACTTTGTTATTTACTTTATAATATGGAACGATGTTTCCGGTTTCTGTAT

CTGTTGTGTGTAAGAGGATATTACAAATAAACGGATAACAACAATTTACTGCAAAAAAAAAAAA

C

CCA GGA GGA CAA GGC GTT GCA GAT GTT TTG TTT GGG GAC TAT GGT TTC
 P G G Q G V A D V L F G D Y G F

ACA GGA AAG CTT CCA CAT ACC TGG CTT AAA AAT GTC CAT CAA CTC CCA ATG
 T G K L P H T W L K N V H Q L P M

AAT GCC GGA GAT GTG CAT TAT AGT CCA CTA TTT GCA TAT GGA TTT GGC CTC
 N A G D V H Y S P L F A Y G F G L

ACC ACT GAT TCG GCC ACA ACA GAT ATT GCT GAT ATG TAA TAACTGGTGAAGGTG
 T T D S A T T D I A D M * *

TGTGACATGAATAAGCTGCAATGTTGAAGCAGCATCCTTTATTTATCTTATTTGCTTTTATATATAT

GGACCTTGTGGTGGCTGGTGTACCTTAGTGTGGCTAGCCTTTTACCACAGTCTACAGCAGGCATG

CATGAGATCATGCACTGTTTTGTAGATTTACCGTCCTCCTGG

Fig. 26: Secuencias de los fragmentos amplificados. Secuencia nucleotídica de los fragmentos clonados en el pCB 62.(A), en el pCB 14 (B) y en el pCB 19 (C). La secuencia deducida de aminoácidos se indica debajo, en el código de una letra. Los asteriscos indican codones de terminación. Las potenciales señales de poliadenilación están subrayadas. Los *primers* empleados en las reacciones de amplificación se indican en letra resaltada.

Zanahoria	PGGQGVADVLF GDYGF T GKLPHTWLK NVHQLP	31
	:	
Cebada	. . . PGGQGVADVLF GDYGF S GKLARTWFKADHQLP	601
Zanahoria	MNAGDVHYSPLFAYGF LTTDSATTDIADM**	62
	: ::	
Cebada	MNVGDKHYDPLFPFGFLTTEAKK*	624

Fig. 27: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos del clon CB19 de zanahoria y de la β -D-glucano exohidrolasa de cebada. La identidad en aminoácidos está indicada por una barra vertical y las sustituciones conservativas por dos puntos; los asteriscos indican codones de terminación.

Inducción de la expresión del mRNA

La demostración de que el *elicitor* obtenido a partir de la pared de *S. sclerotiorum* induce la expresión del mRNA correspondiente al fragmento clonado en el pCB 14 se realizó por medio de dos criterios: RT-PCR y Northern blot.

RT-PCR

En base a la secuencia obtenida, se diseñaron dos *primers* internos, denominados D[CC 10 y DCC 20 (ver MATERIALES Y MÉTODOS), con el propósito de amplificar un fragmento de 280 pb contenido en el pCB 14. Como se observa en el panel A de la fig. 28, utilizando dos diluciones del cDNA para llevar a cabo las reacciones de PCR, el fragmento de 280 pb se amplifica solamente cuando el cDNA utilizado como templado fue sintetizado a partir de RNA proveniente de células de zanahoria incubadas con el EEC (fig. 28 A, calles 3 y 5).

Los resultados obtenidos luego de la amplificación del mismo cDNA con los primers Act 1 y Act 2 —correspondientes al gen de actina de zanahoria (Stranathan *et al.*, 1989)— se muestran en el panel B de la misma figura. El fragmento esperado de 270 pb fue amplificado con ambas diluciones de cDNA, obtenido tanto a partir de RNA extraído de células de zanahoria inducidas con el EEC como con el de células no inducidas (fig. 28 B, calles 1 a 4).

Estas evidencias indican que, por lo menos bajo estas condiciones experimentales, el mRNA correspondiente al fragmento clonado en el pCB 14, se expresa solamente en las células de zanahoria incubadas con el EEC de *S. sclerotiorum*.

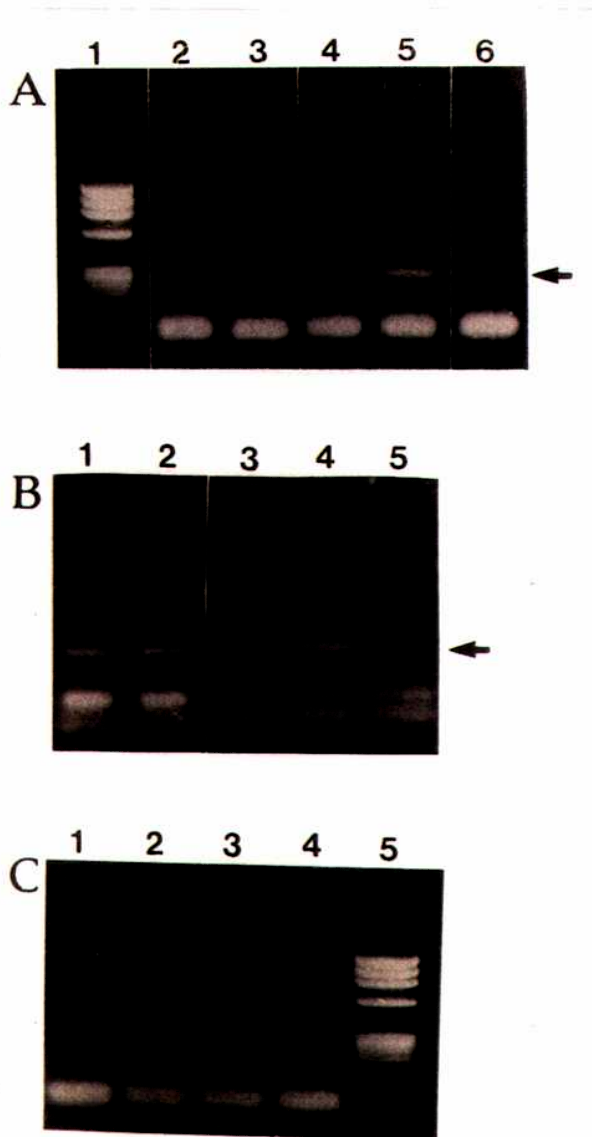


Fig. 28: Análisis de la expresión del mRNA por medio de RT-PCR. La transcripción reversa se realizó sobre RNA total extraído de células inducidas y no inducidas con EEC con el primer T₁₁GC. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa 1.6% y se tiñieron con bromuro de etidio. Las flechas indican la posición de los fragmentos esperados.

Panel A: Expresión del fragmento de 300 pb. PCR sobre 0.01 μ l (calles 2, y 3) y 0.02 μ l (calles 4, 5 y 6) de cDNA sintetizado a partir de RNA de células inducidas con EEC (calles 3 y 5) y no inducidas (calles 2 y 4) con los primers DCC 10 y DCC 20. Calle 1: ϕ X 174/Hae III. Calle 6: blanco de reacción.

Panel B: Expresión de actina. PCR sobre 0.01 μ l (calles 1 y 2) y 0.02 μ l (calles 3 y 4) de cDNA sintetizado a partir de RNA de células inducidas con EEC (calles 2 y 4) y no inducidas (calles 1 y 3) con los primers Act 1 y Act 2. Calle 5: blanco de reacción.

Panel C: Expresión de calmodulina. PCR sobre 0.01 μ l (calles 1 y 2) y 0.02 μ l (calles 3 y 4) de cDNA sintetizado a partir de RNA de células inducidas con EEC (calles 2 y 4) y no inducidas (calles 1 y 3) con los primers Cal 1 y Cal 2. Calle 5: ϕ X 174/Hae III.

Por otra parte, si se busca amplificar un fragmento correspondiente a otro gen de expresión constitutiva, cuyo mRNA no debiera estar representado en el "pool" de cDNAs sintetizados con el *primer* 5'-T₁₁-GC-3', es de esperar que no haya productos de amplificación. En el panel C de la fig. 28 se muestra el resultado obtenido cuando el mismo procedimiento llevado a cabo con los *primers* Act 1, Act 2, DCC 10 y DCC 20 se realiza utilizando los *primers* Cal 1 y Cal 2. Estos últimos fueron diseñados en base a la secuencia de un cDNA de calmodulina de zanahoria (Zielinski *et al.*, 1995), que no contiene las bases GC inmediatamente "upstream" de la cola de poli (A) presente en los mRNA.

Este resultado demostró no solo que una subpoblación de mRNAs fue sustrato de la reacción de transcripción reversa y, por consiguiente, analizada mediante la técnica de «differential display», sino también que no habían quedado trazas de DNA genómico de zanahoria contaminando las muestras de RNA. Este dato refuerza la evidencia de que los resultados mostrados en los paneles A y B de la fig. 24 corresponden a la amplificación específica de productos de expresión.

Northern blot

El mismo RNA utilizado en la reacción de «differential display» —extraído a partir de células de zanahoria inducidas con el EEC o de células controles sin inducir— fue analizado por hibridización con el fragmento clonado en el pCB 14. La tinción con azul de metileno de los rRNAs transferidos a la membrana confirmó que se habían sembrado cantidades equivalentes de RNA en ambas calles del gel.

Cuando se incubó dicha membrana con la sonda radioactiva, una banda intensa, de aproximadamente 1300 pb, fue detectada solamente en la calle correspondiente al RNA extraído a partir de las células de zanahoria incubadas con el EEC (fig. 29 B, calle 2).

Cuando la misma membrana fue lavada y subsecuentemente hibridizada utilizando como sonda un fragmento del gen de actina de zanahoria, se detectó una doble banda de igual intensidad tanto para el RNA proveniente de células inducidas como para el obtenido a partir de células no inducidas con el EEC (fig. 29 C, calles 1 y 2).

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos demostraron que, a diferencia de lo que ocurre con un gen de expresión constitutiva como el de actina, el gen correspondiente al fragmento contenido en el pCB 14 se encuentra expresado solo en las células de zanahoria incubadas con el EEC de *S. sclerotiorum*.

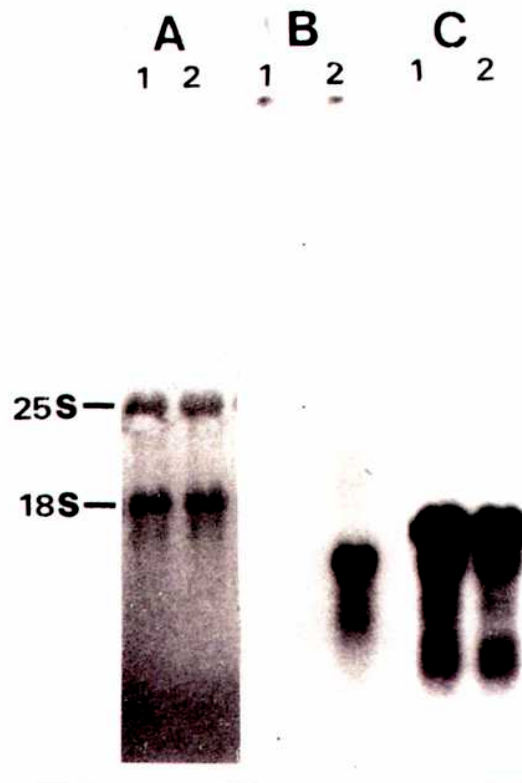


Fig. 29: Análisis de la expresión del mRNA por Northern blot.

Se analizaron 10 μ g de RNA total extraído de células de zanahoria no inducidas (calle 1) e inducidas con EEC (calle 2). *Panel A:* membrana teñida con azul de metileno. *Panel B:* Autoradiografía de la membrana hibridizada con el fragmento proveniente del pCB 14. *Panel C:* Autoradiografía de la membrana hibridizada con el fragmento del gen de actina.

Clonado y secuenciación del cDNA

Con el propósito de obtener la secuencia completa del mRNA cuya expresión es inducida por el agregado de extractos de pared de *S. sclerotiorum* sobre cultivos de zanahoria, se utilizó la técnica de 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Este procedimiento permite "caminar" sobre el mRNA a partir de un extremo 3' de secuencia conocida hacia el extremo 5' cuya secuencia se desea conocer.

Como se muestra en el gráfico de la fig. 30, se diseñó el primer DCC 20 con el que se sintetizó el cDNA. Al término de la degradación con RNasa H de la cadena de mRNA que sirvió de templado y de la posterior incubación con la deoxinucleotidil transferasa —que adiciona deoxicitocinas al extremo 3' del cDNA sintetizado— se realizó una reacción de PCR sobre el cDNA utilizando los primers DCC 21 y Anchor (oligo dG).

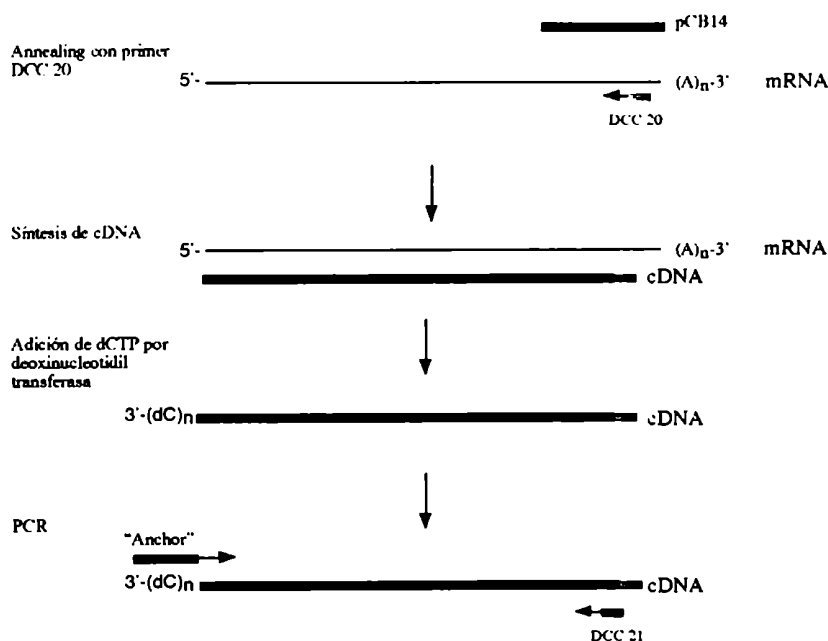


Fig. 30: 5' RACE. Esquema de la técnica empleada para clonar el cDNA.

Luego de dos rondas sucesivas de amplificación, se obtuvo un fragmento de 1338 pb, visualizable por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa. Este fragmento fue clonado en el plásmido pCB 314, cuya secuencia se muestra en la fig. 31.

El análisis de la secuencia mostró que el pCB 314 contenía, a excepción de las últimas bases del extremo 3', todo el fragmento clonado inicialmente en el pCB 14 además de una región N-terminal adicional, comprendiendo un marco de lectura abierto (ORF) de 1173 pb (fig. 31).

El ORF codifica para una proteína de 391 aminoácidos con una masa molecular relativa (M_r) de 42,638 Da.

El codón de iniciación propuesto está flanqueado por la secuencia conservada consenso propuesta por Kozak (1986) como la óptima para la iniciación de la traducción en eucariotas. Este codón ATG está precedido por una región no traducida de 54 bases.

Se encontraron cinco sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-S/T) en las posiciones 63-98-146-186 y 329 de la secuencia deducida de aminoácidos.

El análisis del perfil de hidrofobicidad reveló la presencia de un dominio hidrofóbico en el extremo N-terminal de la proteína. En las posiciones 23-24 se identificó un posible sitio de clivaje proteolítico, descrito como secuencia consenso de clivaje de péptidos señales en diferentes géneros (Von Heijne, 1983).

-54 ATCAAGTAGTATCAAATACCATCCTATCATAAATAGACCAAACAAGTCATTAAGC ATG GGG AAA CAC TCT GCA
1 M G K H S A

19 TTC TCT GIT TTC TTA TTT TCC ATC CTT GTA GCT CAT TCA CAT GTC TCT GCA TCT TCA CAG
7 F S V F L F S I L V A H S H V S A.....S S Q

79 ACT TGT GAT TTT CCA GCA ATC TTC AAC TTC GGT GAT GCA AAC TCC GAC ACG GGT GCA TTC
27 T C D F P A I F N F G D A N S D T G A F

139 GCT GCT TGG TTC TTC GGC AAT CCA CCT TTC TTT GGT CAG TCC TAC TTC AAT GGA TCA GCA
47 A A W F F G N P P F F G Q S Y F N G S A

199 GGA AGA GTC TCC GAT GGA CGC CTA TTG ATC GAT TTC ATG G gtacgcctaaactcctagctccctt
67 G R V S D G R L L I D F M

264 gccatatttttgccctaaacgggatcgctaataatgattttatttttttcag CA ACT GAC TTG GGC TTG CCA TTC
80 A T D L G L P F

334 CTG CAT CCA TAC ATG GAT TCC TTG GGT GCC AAC TTC TCT CAT GGT GCA AAC TTT GCA AAC
88 L H P Y M D S L G A N F S H G A N F A N

394 ATT TTA TCC ACC ATT GCA TTA CCT ACA TCA AAC ATC ATT CCG GGG GTC AGA CCA CCC CGC
108 I L S T I A L P T S N I I P G V R P P R

454 GGA CTC AAT CCT GTC AAT CTC GAC ATT CAG GTG GCT CAA TTT GCA CAA TTC GTA AAC AGA
128 G L N P V N L D I Q V A Q F A Q F V N R

514 TCA CAA ACA CAA G gtttgctagcacattcatatgtaccttttttaacattattatcttgatgatatagtgcc
148 S Q T Q

588 gtttgagaacgcctctcttagctttttcttgataaaaacgggcttcagtttttattgaccgtttgtgtaaaaaagctaga
667 agtactttgagaatgctaactttttgtttcaggattttctgctgtttcccaaacagtttaacogcttataagttctaattt
746 acatcttacttctagttcacttctttactttaaagaagaagtacttttttaaagtttaccctaaacggccccaataata
825 tgatactagtcaactatagaatcctagaattagtttttttcggctagaagacacgggcccctcctaaattcacattaa
904 aaaaaattgagttgagccatccaattgaaaaccccgctcataaatatgttgtaataatcgatgtcaggactgagactc
983 atatatatacgttttagataagtggttcttatctttttcag GA GAA GCT TTC GAC AAT TTC ATG CCA AAA
152 G E A F D N F M P K

1052 CAG GAC TAC TTT TCG CAA GCT TTA TAT ACT CTT GAT ATA GGA CAA ATC GAT ATC ACC CAA
162 Q D Y F S Q A L Y T L D I G Q I D I T Q

1112 GAG TTC TTA ACA AAT AAG ACT GAC GAT GAA ATT AAA GCC GTT GTA CCA GGC CTG ATC AGT
182 E F L T N K T D D E I K A V V P G L I S

1172 AGC TTA TCC TCA AAT ATA CAG gtgaaccatatatagaactacatactttaatgtcaatatagaaggataaag
202 S L S S N I Q

1244 ataagtagttggagcagttcttctgtgatagatattaatgttaaacatatgtaactttacag ATT TTA TAT AGC CTG
209 I L Y S L

1319 GGA GGT AGA TCA TTC TGG ATC CAT AAC CTC GGA CCT AAT GGC TGT CTT CCA ATT CTT TTG
214 G G R S F W I H N L G P N G C L P I L L

1379 ACA CTG GCT CCA GTC CCA GAC GAT CAG CTT GAC AGT GCT GGT TGT GCA AAA CGC TAC AAT
234 T L A P V P D D Q L D S A G C A K R Y N

```

1439 GAT TTA ACT CAA TAC TTC AAT TCG GAA CTA AAG AAG GGC GTT GAT CAG CTT CGA ACC GAC
254 D L T Q Y F N S E L K K G V D Q L R T D

1499 CTC CCC TTG GCA GCT GTC ACC TAT GTT GAT GTG TAT ACT GCT AAG TAT TCC CTT TAT CAG
274 L P L A A V T Y V D V Y T A K Y S L Y Q

1559 GAA CCA GCA AAA TAC G gtaagcatacggatatatgttactccctcaagtactctaagatgcaaaagtaggggt
294 E P A K Y

1632 ccttgtaacagttatgtcgaaagagtcataaaaatgaggcgacaggagcaaaatttagtgtgcgcgtaattttactag
1711 tgttcatgttactaatcaactaaatggtgcag GA TTC ACA CAT CCA CTA GAA ACA TGT TGT GGA TTT
299 G F T H P L E T C C G F

1778 GGA GGA AGA TAT AAT TAT GGA GAG TTC AGC TTG TGC GGT TCA ACA ATA ACT GTA AAC GGG
311 G G R Y N Y G E F S L C G S T I T V NG

1838 ACT CAG TTA ACT GTT GGA CCC TGT GAA AAT CCT GCA GAG TAC ATA AAC TAC GAA GGC CAA
331 T Q L T V G P C E N P A E Y I N Y E G Q

1898 ACG TAC ACT CAG GCA GCT GAT CAA ATT ACT TTT AAC AAG ATT TCT ACG GGA GAA TTG TCC
351 T Y T Q A A D Q I T F N K I S T G E L S

1958 GAT CCA CCT AAT TCA CTC AAA ACG GCT TCC CCC AAA TTG TCA TTA CCT CGT GTC AGT GAC
371 D P P N S L K T A C P K L S L P R V S D

2018 ATA TGAGCTATTTTTATGTATTATGGTCGGTATTTTTTTGAGCTACTTTTGTATTACTTATAATATGGAACGATGTTT
391 I *

2096 CCGGTTTCCTGTATCTGTGTGTGTAAGAGGATATTACAATAAACCGAATAACAACAATTTACTGC

```

Fig. 31: Secuencia nucleotídica de iEP4. Los nucleótidos están numerados a partir del codón de iniciación. Los intrones están indicados en letra minúscula. La secuencia deducida de aminoácidos se indica debajo, en el código de una letra. Las señales de poli adenilación están subrayadas y los potenciales sitios de N-glicosilación están doblemente subrayados. Los aminoácidos involucrados en el potencial sitio de clivaje del péptido señal están subrayados con línea de puntos. El asterisco indica el codón de terminación. La secuencia del clon original de 307 pb está comprendida entre los nucleótidos 1853 y 2161.

Clonado y secuenciación de un clon genómico

El producto de amplificación obtenido utilizando los *primers* DCC 4 y DCC 6 (ver MATERIALES Y MÉTODOS) sobre DNA genómico de zanahoria (Fig. 32, calle 1) es de mayor tamaño que aquel obtenido a partir de cDNA (fig. 32, calle 2). Este resultado sugirió la posibilidad de que el gen se encontrara interrumpido por intrones.

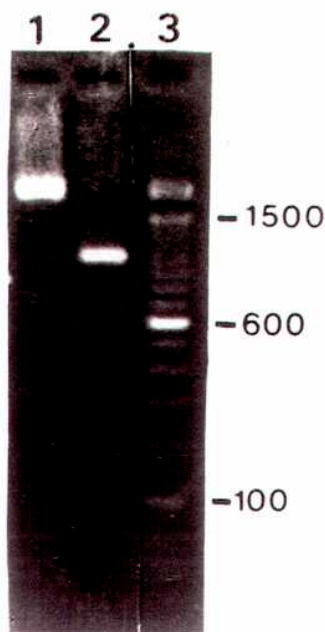


Fig. 32: Reacción de PCR sobre cDNA y DNA genómico de zanahoria. La reacción de PCR se llevó a cabo según se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS utilizando como templado DNA genómico (calle 1) o cDNA (calle 2) de zanahoria. Los productos de la reacción fueron corridos en un gel de agarosa 1.6% y teñidos con bromuro de etidio. Calle 3: Estandar de peso molecular, 100 pb DNA ladder.

El producto de una PCR sobre DNA genómico con los primers DCC 4 y DCC 20 fue clonado en el pCB414. La fig. 31 muestra la secuencia de un fragmento 2089 pb del plásmido pCB414, que incluye el fragmento contenido en el pCB314. El análisis de la secuencia reveló la presencia de 4 intrones de 72-496-111 y 168 pb respectivamente, indicados en letra minúscula en la fig. 27. La

secuencia conservada "exón-GTintrónAG-exón" característica de los pre-mRNAs eucarióticos (Jacob y Gallinaro, 1989) está presente en los 4 intrones hallados.

Con la secuencia completa del cDNA se realizó una nueva búsqueda de homología en el GENE BANK. Así, se encontró que el ORF contenido en el pCB314 mostraba un 55% de identidad con el producto deducido del gen ENOD 8 de alfalfa (Dickstein *et al.*, 1993) y, además, una identidad de casi el 100% con una secuencia que fue ingresada al banco de datos prácticamente al mismo momento en el que se efectuaba esta búsqueda. Esta última corresponde a una glicoproteína denominada EP4a, aislada a partir de sobrenadantes de cultivos de zanahoria por Van Engelen y colaboradores (1995).

En base a este resultado, el ORF contenido en el pCB314 fue designado iEP4 (EP4 inducible), para distinguirla de la secuencia descrita por los mencionados autores.

En la fig. 33 se muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de iEP4 y EP4a. Las secuencias difieren en 3 aminoácidos —L por W; L por I y T por A en las posiciones 233,243 y 334 respectivamente—de los cuales dos son funcionalmente conservados.

Por otra parte, el fragmento clonado en el pCB 314 contiene los 8 primeros aminoácidos que no están presentes en la secuencia de EP4a, abarcando de este modo la secuencia completa de la glicoproteína.

```

iEP4 MGKHSAFSVFLFSILVAHSHVSASSQTCDFPAIFNF 36
      |||
EP4a  VFLFSILVAHSHVSASSQTCDFPAIFNF 28

iEP4 GDANSDTGAFAAWFFGNPPFFGQSYFNNGSAGRVS DG 72
      |||
EP4a GDANSDTGAFAAWFFGNPPFFGQSYFNNGSAGRVS DG 64

iEP4 RLLIDFMATDLGLPFLHPYMSLGFANFSGANFANI 108
      |||
EP4a RLLIDFMATDLGLPFLHPYMSLGFANFSGANFANI 110

iEP4 LSTIALPTSNIIPGVRPPRGLNPNVLDIQVAQFAQF 144
      |||
EP4a LSTIALPTSNIIPGVRPPRGLNPNVLDIQVAQFAQF 136

iEP4 VNRSQTQGEAFDNFMPKQDYFSQALYTLDIGQIDIT 180
      |||
EP4a VNRSQTQGEAFDNFMPKQDYFSQALYTLDIGQIDIT 172

iEP4 QEFLTNKTDDEIKAVVPGLISSLSSNIQILYSLGGR 216
      |||
EP4a QEFLTNKTDDEIKAVVPGLISSLSSNIQILYSLGGR 208

iEP4 SFWIHNLGPNGLPILLTLAPVPDDQLDSAGCAKRY 252
      |||
EP4a SFWIHNLGPNGLPILWTLAPVPDDQIDSAGCAKRY 244

iEP4 NDLTQYFNSELKKGVDQLRTDLPLAAVTYVDVYTAK 288
      |||
EP4a NDLTQYFNSELKKGVDQLRTDLPLAAVTYVDVYTAK 280

iEP4 YSLYQEPAKYGFTHPLETCCGFGGRYNYGEFSLCGS 324
      |||
EP4a YSLYQEPAKYGFTHPLETCCGFGGRYNYGEFSLCGS 316

iEP4 TITVNGTQLTVGPCENPAEYINYEQTQYTAADQIT 360
      |||
EP4a TITVNGTQLAVGPCENPAEYINYEQTQYTAADQIT 352

iEP4 FNKISTGELSDPPNSLKTACPKLSLPRVSDI* 396
      |||
EP4a FNKISTGELSDPPNSLKTACPKLSLPRVSDI* 383

```

Fig. 33: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de iEP4 y EP4a. La identidad en aminoácidos está indicada por una barra vertical, las sustituciones conservativas están indicadas por dos puntos.

Los resultados presentados recientemente por Van Engelen muestran que la glicoproteína EP4a es secretada al medio de cultivo, a partir del cual fue posible purificarla. Tomando en consideración estos resultados, si bien en el trabajo no se muestra un análisis de la expresión del mRNA de EP4a, se podría inferir que, si la glicoproteína EP4a fue aislada a partir del medio de cultivo de células de zanahoria, debiera detectarse su correspondiente mRNA. Esto reflejaría una aparente contradicción con los resultados presentados en los experimentos de Northern blot y RT-PCR llevados a cabo con RNA extraído de células no inducidas con el EEC. Una posible explicación sería que por algún motivo —p.ej. una estricta regulación de la síntesis y degradación del mRNA— la concentración efectiva del mRNA de iEP4 en un momento dado sea tan baja que escapa a la sensibilidad de las técnicas empleadas. Para analizar esta posibilidad se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR en las mismas condiciones que las empleadas en el experimento correspondiente a la fig. 28 pero incrementando la cantidad de cDNA utilizado como templado.

Como puede observarse en la fig. 34, a medida que aumenta la concentración del cDNA utilizado como templado, comienza progresivamente a aparecer el producto de 280 pb esperado de las reacciones de amplificación, llegando a condiciones en las que la diferencia se hace prácticamente imperceptible.

Este resultado puso de manifiesto que, si bien las células de zanahoria poseen un nivel de expresión basal del mRNA analizado, el agregado del EEC de *Sclerotinia sclerotiorum* al medio de cultivo induce un incremento, del orden de 5 a 10 veces, en la expresión del mRNA de iEP4.

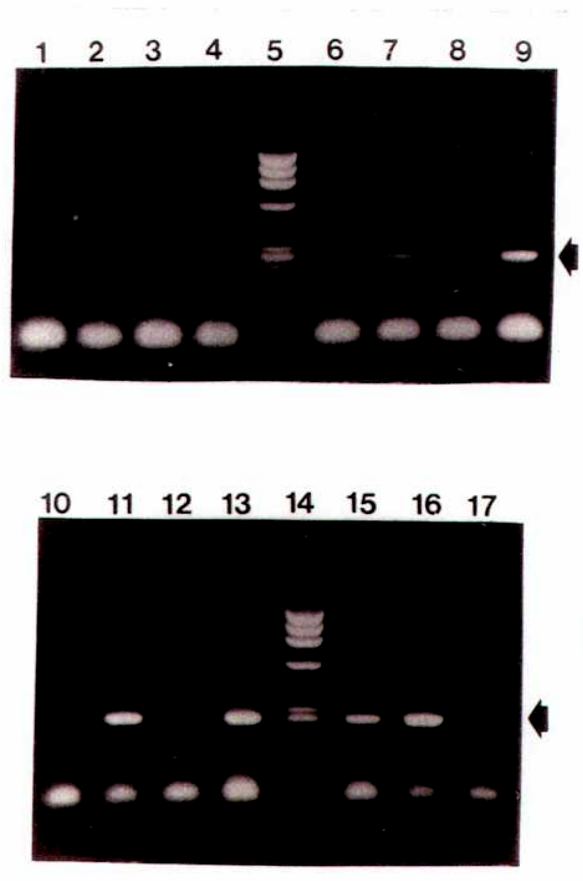


Fig. 34: Análisis del nivel de expresión del mRNA de iEP4. Se sintetizó cDNA sobre RNA total extraído a partir de células inducidas y no inducidas con el EEC (5 μ g) con el primer T₁₁GC. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con muestras de 0.01 a 1 μ l de cDNA utilizando los primers DCC10 y DCC 20. Los productos se analizaron en un gel de agarosa 1.6% teñido con bromuro de etidio.

Calles 1 (0.01 μ l), *3* (0.02 μ l), *6* (0.05 μ l), *8* (0.1 μ l), *10* (0.2 μ l), *12* (0.5 μ l) y *15* (1 μ l) corresponden a células no inducidas.

Calles 2 (0.01 μ l), *4* (0.02 μ l), *7* (0.05 μ l), *9* (0.1 μ l), *11* (0.2 μ l), *13* (0.5 μ l) y *16* (1 μ l) corresponden a células inducidas.

Calles 5 y 14: Estandar de peso molecular (ϕ X 174/Hae III).

Calle 17: blanco de reacción

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la incubación de células de zanahoria con extractos de pared del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* inducen cambios en el patrón de expresión de sus genes. Mediante el empleo de la técnica de «differential display» se detectaron *polimorfismos* que claramente diferencian a las células inducidas con el *elicitor* fúngico de las controles no inducidas.

Tres *polimorfismos* fueron clonados y posteriormente secuenciados. Todos mostraron reunir las características de los extremos 3' terminales de los mRNA eucarióticos: señales de poliadenilación y uno o dos codones de terminación a partir de los cuales se encuentra un marco de lectura abierto que se extiende hacia el extremo 5' de los fragmentos.

El fragmento clonado en el pCB62 no mostró una homología significativa con las secuencias registradas en el GENE BANK. Dado que, al menos por la técnica de «differential display», representaría un gen con una marcada expresión diferencial (fig. 24, calle 2, banda de 200 pb), se proyecta en el futuro continuar con su clonado y caracterización.

La comparación del pCB19 con las secuencias registradas en el GENE BANK mostró que es altamente homólogo a la β -D glucano exohidrolasa de *Hordeum vulgare* (Hrmova *et al.*, 1996). La identificación de β -1,3-glucanasas como proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR) fue en principio llevada a cabo en tabaco (Kauffmann *et al.*, 1987, Legrand *et al.*, 1987). A partir de la observación de que estas enzimas tienen la propiedad de inhibir el crecimiento fúngico (Mauch *et al.*, 1988) y de degradar β -glucanos del tipo de los presentes en las paredes fúngicas, se propuso que, además de inhibir directamente el crecimiento miceliar, su rol consistiría en liberar oligosacáridos con actividad "elicitor" a partir de las paredes fúngicas de especies fitopatógenas, iniciando la cascada de eventos de defensa en las plantas. Así se demostró que la infección de plántulas de soja con *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* induce la síntesis de una β -glucanasa. Esta enzima, una vez purificada, presentó la propiedad de liberar residuos glicosídicos a partir de extractos de pared del hongo que efectivamente presentaban actividad "elicitor" al ser ensayados sobre cultivos de soja (Ham *et al.*, 1991).

La glucanasa purificada por Hrmova fue aislada a partir de plántulas de cebada de 8 días. A partir de la secuencia del cDNA se dedujo que sería una glicoproteína de secreción, ya que posee un probable péptido señal de 22 aminoácidos. Si bien los autores demostraron que los sustratos de esta enzima son β -1,3 y β -1,3-1,6-glucanos, su función biológica aún no ha sido determinada.

La alta probabilidad de que las células de zanahoria posean esta enzima y que su expresión se encuentre inducida por extractos de pared de *S. sclerotiorum*, sugiere que podría formar parte del sistema de defensa de las plantas ante las infecciones microbianas. Basado en los resultados mostrados en el capítulo 2, el hecho de que los polisacáridos presentes en el extracto de pared de *S. sclerotiorum* son degradados por enzimas presentes en las células de zanahoria y que uno de los "elicitors" aislados es un glucano, sumado a que los polisacáridos de gran tamaño no pueden atravesar las paredes celulares vegetales, permite especular acerca del rol de esta enzima en la activación de los mecanismos de defensa en las plantas frente a una infección por el mencionado patógeno. En este sentido, se llevarán a cabo en nuestro laboratorio experimentos que permitirán saber si la enzima tiene la propiedad de degradar el glucano presente en las paredes de *S. sclerotiorum* y si los productos resultantes poseen actividad "elicitor". De ser así, se abriría la expectativa de obtener plantas transgénicas para probar su nivel de tolerancia frente a una infección con *S. sclerotiorum*.

Por otra parte, como se mencionó en la introducción, la matriz extracelular de las células vegetales es la primera línea de defensa contra los microorganismos. Las plantas responden al ataque por fitopatógenos—así como también a otras clases de stress de naturaleza abiótica—modificando o reforzando sus paredes celulares (Bowles, 1990). Se ha demostrado que el agregado de *elicitors* a cultivos celulares en suspensión induce la acumulación de proteínas (HGRPs y GRPs) que aumentan la rigidez de las paredes celulares. En particular, en el caso de zanahoria, Chen y Varner (1985) demostraron una acumulación de transcritos de extensina, una proteína rica en hidroxiprolina, en respuesta al daño mecánico. En 1992, Satoh y col. demostraron que cultivos en suspensión de zanahoria sintetizan y secretan la glicoproteína EDGP al medio de cultivo. La expresión de esta glicoproteína aumenta a medida que las plántulas crecen y forman tejidos epidérmicos, así como también en respuesta al daño mecánico. Sin embargo, no se detectó un aumento en los niveles de expresión del mRNA en respuesta a la infección de la planta con el patógeno *Erwinia carotovora*.

En este capítulo se describe la identificación y el clonado de un nuevo gen de zanahoria inducible por stress, que fue designado iEP4 en virtud a la identidad encontrada con la glicoproteína EP4a recientemente descrita por Van Engelen (1995). Los mencionados autores demostraron que esta glicoproteína, a semejanza de lo observado para EDGP, es secretada al medio de cultivo y que una isoforma de ella, denominada EP4b, está asociada a las paredes de las células de zanahoria. El análisis por Western-blot de las proteínas aisladas de diferentes partes de la planta mostró que se acumula en raíz y en menor proporción en cotiledones e hipocotiles. Los resultados aquí

presentados demuestran que el nivel de expresión del gen de iEP4 se incrementa cuando las células de zanahoria son expuestas a un *elicitor* obtenido a partir de la pared del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*; resultados que concuerdan con la actual visión general de que las paredes celulares de las plantas y las proteínas relacionadas a ellas tendrían un rol importante en los procesos de desarrollo de tejidos y en las reacciones de defensa frente a infecciones.

El análisis de la secuencia del fragmento de 300 pb contenido en el pCB14 reveló que el producto de amplificación señalado en la fig. 24, panel A, presentaba las características de un mRNA que está presente en las células de zanahoria inducidas con el elicitor fúngico y ausente, o presente a niveles muy bajos, en las células controles no inducidas. Mediante la técnica de 5'-RACE, a partir de este pequeño fragmento de cDNA se obtuvo un clon (pCB314) que mostró contener la secuencia completa del cDNA. El análisis de la secuencia contenida en este clon reveló que contenía un ORF que codificaría para una proteína ácida (con un punto isoelectrico estimado de 4.66) de 391 aminoácidos, con una masa molecular relativa de 42,638. Habida cuenta de que la proteína presentó una identidad cercana al 100% con la glicoproteína EP4a aislada por Van Engelen y col. (1995), se la denominó iEP4 (EP4 inducible). La comparación de ambas secuencias (fig. 33) muestra que son prácticamente idénticas, difiriendo solamente en tres residuos aminoacídicos. Sin embargo, el fragmento clonado en el pCB314 contiene el ORF completo de la glicoproteína, incluyendo los primeros 8 aminoácidos del extremo amino terminal faltantes en la secuencia de EP4a publicada (Van Engelen *et al.*, 1995). El fragmento comprendido desde la metionina inicial hasta el potencial sitio de clivaje proteolítico hallado a continuación de la alanina de la posición 23 mostró ser altamente hidrofóbico, lo cual concuerda con el hecho de que la glicoproteína es secretada al medio de cultivo, a partir del cual fue aislada EP4a.

El análisis por Western blot realizado por los mencionados autores mostró que la glicoproteína tiene un PM de 47 KDa. La diferencia de tamaño de EP4a con respecto al deducido a través de la secuencia de iEP4 puede atribuirse al grado de glicosilación de la proteína madura, ya que en la secuencia se encontraron 5 sitios potenciales de N-glicosilación.

Los experimentos de RT-PCR y Northern blot (figuras 28 y 29 respectivamente) mostraron que la expresión del gen de iEP4 se detecta únicamente en células inducidas. Sin embargo, tomando en consideración que la glicoproteína fue originalmente aislada del medio de cultivo de la misma línea celular de zanahoria (Van Engelen *et al.*, 1995), se estudió por RT-PCR la posibilidad de que las células tuvieran un nivel basal de expresión de iEP4. Los resultados mostrados en la fig. 34 demostraron que aumentando la concentración del cDNA utilizado como templado en

reacciones de RT-PCR, aparece el fragmento de amplificación de 280 pb esperado. Como puede observarse en la calle 15 de la fig. 34, empleando 1µl del producto de la reacción de transcripción reversa —lo que equivale aproximadamente a 300ng del RNA originalmente usado como templado en la síntesis del cDNA— se obtuvo el producto de amplificación esperado a partir de RNA aislado de cultivos no inducidos con el *elicitor* de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Descartando una probable contaminación con DNA genómico por el tratamiento con DNAsa realizado sobre las muestras de RNA analizadas, se consideró a este resultado como una confirmación de que las células de zanahoria expresan constitutivamente el gen de iEP4, aunque probablemente su nivel de expresión sea tan bajo que escapa al nivel de sensibilidad de las condiciones empleadas en el experimento de Northern blot.

Por otra parte, cabe destacar que es interesante la homología encontrada entre iEP4 y ENOD 8 (early alfalfa nodulin 8), ya que la inducción de la expresión de algunas nodulinas tempranas es una de las primeras respuestas que se observa en las plantas durante establecimiento de una relación simbiótica con las bacterias de la familia Rhizobiaceae.

La acción de los factores Nod producidos por las bacterias es crucial en el establecimiento de la simbiosis (Dénarié y Cullimore, 1993). Su función consiste en disparar los cambios morfológicos que se producen en las raíces de las plantas hospedadoras que finalmente conducen a la formación de los nódulos fijadores de nitrógeno. En la fase temprana del establecimiento de la simbiosis, los factores Nod inducen una serie de respuestas en las plantas que comparten algunas características con las respuestas de defensa frente a infecciones. Cuando las raíces de plantas leguminosas son incubadas con los correspondientes factores Nod se detectan en las plantas cambios en los potenciales transmembrana de Ca^{++} y se induce la vía de fenilpropanoides con la subsecuente síntesis de flavonoides que actúan como agentes quimiotácticos de las bacterias. En las etapas tempranas de la interacción entre *Bradyrhizobium japonicum* y soja se induce la transcripción de los genes de fenilalanil amonio-liasa (PAL) y Chalcona sintetasa (CHS), cuya expresión es considerada un marcador de la respuesta de defensa de las plantas al ataque por microorganismos fitopatógenos (Dixon y Lamb, 1990). Por lo demás, en esta etapa se induce la expresión de los genes correspondientes a las nodulinas tempranas (genes ENOD). Se ha observado que la sola presencia de los factores Nod es necesaria y suficiente para inducir la expresión de algunas nodulinas por parte de la planta (Horvath *et al.*, 1993).

La actividad biológica de los factores Nod y su similitud estructural con los *elicitors* fúngicos como los quitosanos —basicamente consisten en un esqueleto de tetrámeros o pentámeros de β -

1,4-N-acetilglucosamina, con distintos sustituyentes de acuerdo a la especie de *Rhizobium*—permite especular acerca de que esta clase de moléculas podrían actuar como «elicitors» de la simbiosis, y que los procesos de reconocimiento y transducción de señales que conducen a dos respuestas diferentes como la simbiosis o la defensa frente a infecciones, podrían ser similares en las primeras etapas de la interacción.

Debido a la homología compartida entre iEP4 y ENOD 8 se podría especular que estas proteínas pertenecen a una familia de genes de respuesta temprana de las plantas frente a los microorganismos.

Por último, cabe destacar que la comprensión de los procesos celulares se verá facilitada en la medida en que se identifiquen los genes que en ellos participan. De aquí la importancia del desarrollo de técnicas de biología molecular que permitan clonar genes involucrados en procesos específicos de modo simple y eficiente. En este sentido, basado en la simplicidad de su manejo, la técnica de «differential display» se presenta como una alternativa válida para detectar y aislar genes que no estén constitutivamente expresados. Este método fue utilizado exitosamente para aislar oncogenes y genes supresores de tumores en células epiteliales mamarias (Liang *et al.*, 1992, Sager *et al.*, 1993), genes inducibles por factores de crecimiento en fibroblastos (Donohoe *et al.*, 1994) y protooncogenes asociados al desarrollo de tumor de mama en ratón (Zhang *et al.*, 1993). En plantas, ha sido utilizado para clonar genes involucrados en el proceso de maduración de las frutillas (Wilkinson *et al.*, 1995), genes inducibles por giberelina en arroz (Van der Knaap y Kende, 1995) y genes de respuesta al tratamiento con ozono en arábido (Sharma y Davis, 1995). Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que esta técnica también resulta de gran utilidad para clonar genes involucrados en la respuesta de las plantas frente a las infecciones producidas por microorganismos. Es de esperar que continuando su aplicación al estudio de la interacción entre *S. sclerotiorum* y huéspedes susceptibles, se pueda contar con herramientas válidas que, en un futuro, permitan proteger a aquellos cultivos de interés agronómico de las infecciones causadas por este virulento patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa de Sclerotinia sclerotiorum:

La cepa n^o16, altamente virulenta, fue aislada en 1986 por el Ing. E. Teyssandier de la empresa Cargill, a partir de cultivos de girasol infectados .

Condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue extracto de papa glucosado (EPG) líquido o sólido (agar 1.8%). Las cajas de petri fueron inoculadas en forma esteril con un esclerocio del patógeno previamente esterilizado superficialmente durante 1 min con hipoclorito de sodio (5%). Luego se las incubó durante 7 días a 21 °C.

A partir de estos cultivos se tomaron pequeños discos de agar para inocular medios de cultivo líquido. Luego de una incubación de 5 días a 21 °C sin agitación, se cosechó el micelio que fue utilizado para la obtención del extracto elicitor.

Para la marcación in vivo de los azúcares de pared *S. sclerotiorum*, se inocularon medios de cultivo líquidos (EPG). Al cabo de 2 días, se transfirió la masa miceliar a un erlenmeyer con agua y 50 µCi de [U-¹⁴C]-D-glucosa (Du Pont NEN[®]). Al cabo de 7 días de incubación a 21 °C sin agitación, los cultivos fueron cosechados y procesados para obtener extracto elicitor.

Cultivo vegetal:

En todos los ensayos se utilizó la línea celular ZA⁺ de *Daucus carota* (Filippini *et al.* 1992).

Condiciones de cultivo

Para todos los experimentos se utilizaron cultivos celulares en suspensión de 10 días, a menos que se especifique lo contrario. La línea celular fue mantenida en medio sólido; siempre que fuera necesario estos callos eran disgregados en forma esteril y utilizados para iniciar los cultivos líquidos. Los cultivos en suspensión fueron incubados a 24 °C con agitación rotatoria (60 rpm) y mantenidos por repiques a medio fresco cada 10 días. En todos los casos se utilizó el medio B5 (Quesada-Allué *et al.*, 1993).

Cepas bacterianas y plásmidos

Para todos los procesos de clonado se utilizó *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene).

Los productos de PCR fueron ligados en el vector pGEM-T (Promega). Los plásmidos construídos para el trabajo experimental de esta tesis están descriptos en el texto de las secciones correspondientes.

Condiciones de cultivo

Escherichia coli fue cultivada en medio LB (Triptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l) a 37 °C con agitación rotatoria (200 rpm). Cuando fue necesario se adicionó ampicilina (100 µg/ml).

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Obtención del extracto crudo de pared de Sclerotinia sclerotiorum

Para obtener el extracto crudo de paredes fúngicas a partir de *S. sclerotiorum* se procedió de acuerdo al método de Ayers *et al.* (1976b). El hongo fue cultivado en medio líquido y el micelio fue cosechado antes de que comenzaran a desarrollarse esclerocios (aproximadamente 7 días). Para la ruptura del mismo se utilizó un *Omni-mixer* (Sorvall), agregando 3 partes de agua bidestilada por parte de micelio obtenido (V/V). Luego de centrifugar a 12000 g durante 10 min, el pellet fue resuspendido en metanol:cloroformo (1:1). Se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min y se resuspendió el pellet en acetona. Luego de centrifugar a 12.000 x g durante 10 min, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Posteriormente, este pellet fue resuspendido en agua bidestilada, autoclavado 1 hora a 121 °C a 1 atm. y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue denominado extracto elicitor.

A menos que se especifique lo contrario, los experimentos fueron llevados a cabo utilizando 100 µg de glucosa equivalentes de extracto elicitor por ml de cultivo de células de zanahoria.

Determinación de la actividad de la fenilalanil amonio-liasa

La determinación de esta enzima se realizó en las siguientes condiciones: el extracto celular (200 µg de proteínas) fue incubado en buffer borato de sodio 50 mM (pH 8.8) y fenilalanina 10 mM a 40 °C durante 1 h. El producto formado (ácido *trans*-cinámico) fue estimado por absorción a 290 nm.

El extracto celular fue obtenido a partir de 3 g de células de zanahoria (peso húmedo). La ruptura de las células se llevó a cabo en mortero con nitrógeno líquido. El material fue resuspendido en buffer fosfato de potasio 200 mM (pH 8.2), EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 20 mM, y se

centrifugaron a 12.000 x g durante 10 min. El sobrenadante fue utilizado como fuente enzimática.

Dosaje de proteínas y carbohidratos

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry. Las curvas de calibración fueron realizadas con seroalbúmina bovina.

Los hidratos de carbono fueron medidos por el método de antrona-ácido sulfúrico. (Dische, 1962). Las curvas de calibración se realizaron con glucosa.

Tratamientos químicos

Hidrólisis ácida total: Los compuestos a analizar se disolvieron en una solución de HCl 1 N en un volumen final de 200 μ l y se los incubó en un baño a ebullición durante 4 horas en un tubo sellado. Se eliminó el HCl por evaporación con corriente de aire, con tres agregados sucesivos de 500 μ l de agua. Los productos de la hidrólisis fueron resuspendidos en agua y analizados como se indica en cada caso.

Tratamientos enzimáticos

Glicosidasa de intestino de caracol: La enzima fue preparada en el laboratorio a partir de intestino de caracol (*Helix pomatia*), en todos los casos se usaron 10 μ l de la preparación enzimática cruda, con los que se obtuvo una muy buena actividad (De Stevens, 1955). Los compuestos a analizar (100 μ g de glucosa equivalentes) fueron disueltos en 1 ml de buffer acetato de sodio 100 mM pH 4.5 y se incubaron con 10 μ l de la enzima durante toda una noche a 37 °C en atmósfera de tolueno. La reacción se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 3 min. Después de centrifugar y esterilizar los sobrenadantes por filtración, los productos de la reacción fueron utilizados para inocular cultivos de zanahoria según se indica en cada caso. Las células fueron incubadas con 10 μ g de glucosa equivalentes/ml de cultivo.

Proteasa: Se utilizó una mezcla de proteasas (tipo XXV de *S. griseus*, tipo IV de *S. caespitosus*, y tipo VIII de *B. subtilis*). El extracto elicitor (100 μ g de glucosa equivalentes) fue incubado en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con 2 U de proteasas a 37 °C durante 12 h. La reacción fue detenida por calentamiento a 100 °C durante 3 min. Los productos de la reacción fueron esterilizados por filtración y utilizados para inocular cultivos de zanahoria según se indica en cada caso. A cada cultivo se le adicionaron 10 μ g de glucosa equivalentes/ml medio.

β -(1-3)-Glucosidasa: Los extractos citosólicos provenientes de células de zanahoria incubadas con EEC o agua fueron utilizados como fuente enzimática (20 mg de proteína). La reacción fue llevada a cabo en acetato de sodio (pH 5.0) 10 mM, utilizando Glucano β -1,3- β -1,6-[¹⁴C]-

glucosa ($1.0 \cdot 10^5$ cpm) como sustrato. El glucano fue sintetizado *in vitro* a partir de membranas internas de *Bradyrhizobium Spp.* (Iñón de Iannino y Ugalde, 1993). Se incubó durante 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 3 min, se centrifugó y se analizaron los sobrenadantes en cromatografías en papel descendente con solvente B.

Columna de tamíz molecular

Bio-Gel A 0.5M: Se utilizaron columnas de 1 x 75 cm equilibradas con buffer acetato de piridina 100 mM (pH 5.5). El material fue eluído con el mismo buffer y los azúcares de cada fracción fueron cuantificados por el método de antrona-ácido sulfúrico o se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

Bio-Gel P4: Se utilizó una columna de 1.8 x 78 cm equilibrada con buffer acetato de piridina 100 mM (pH 5.5). El material fue eluído con el mismo buffer y la radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido.

Columna de intercambio iónico

Se utilizó una columna de DEAE-Sephadex A-25 (0.6 x 8 cm) equilibrada con agua. Los productos sembrados fueron eluídos con 6 ml de H₂O y con 6 ml de cada una de las siguientes soluciones: NaCl 50 mM, 100 mM, 200 mM y 500 mM. Se recogieron fracciones de 1.5 ml. En todas se cuantificaron azúcares y proteínas o se midió la radioactividad según fuera necesario.

Columna de Concanavalina A-Sepharosa

La fracción neutra eluída de la DEAE fue concentrada, resuspendida en buffer Con A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM) y sembrada en una columna de Con A-Sepharosa (Pharmacia) de 0,6 x 3 cm equilibrada en buffer Con A. Se lavó con buffer Con A y luego se pasaron por la columna 5 ml de buffer Con A conteniendo α -metilmanósido al 8% a 4 °C. Luego se dejó la columna a 37 °C durante 30-60 min al cabo de los cuales se eluyó a 37 °C con buffer Con A conteniendo 8% α -metilmanósido.

Las fracciones correspondientes al percolado y al eluído con α -metilmanósido fueron pasadas por una columna de Sephadex G-10 fino (Pharmacia) equilibrada y corrida en isopropanol 7%. Los excluidos fueron concentrados y se midió la concentración de azúcares o radioactividad según el caso.

Análisis de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos raramente se hallan en forma libre en los tejidos vegetales, prácticamente siempre se los encuentra en forma conjugada como ésteres o glucósidos. La

determinación de las moléculas constitutivas de los derivados hidroxycinámicos puede ser realizada a través de la hidrólisis de estos compuestos.

Hidrólisis básica: Se cosecharon las células por centrifugación y se lavaron con agua. El material fue luego transferido a un tubo eppendorf y macerado con metanol 80% en ebullición. La mezcla fue posteriormente hervida durante 2 min y centrifugada a 12.000 x g. El extracto metanólico fue evaporado a sequedad y posteriormente se redisolvió el residuo en agua. En vacío, en evaporador rotatorio la solución fue llevada a NaOH 2 N y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 3 h. Después de transcurrido ese tiempo, la solución saponificada fue acidificada con HCl concentrado (hasta pH 3) y extraída por partición con eter etílico 2 veces. La fracción eterea fue evaporada a sequedad y el residuo fue resuspendido en un volumen apropiado de etanol.

Cromatografías y electroforesis

Electroforesis en papel

Las electroforesis se desarrollaron durante dos horas a 20 V/cm en el buffer A (borato de sodio 50 mM (pH 9.2) (Forster, 1957).

Los estandares fueron revelados por el método de la plata alcalina (Trevelyan et al. 1950). La radioactividad fue detectada con un radiocromatógrafo Scanner Model 7201 (Packard).

Cromatografía en papel

Las cromatografías fueron desarrolladas sobre papel Whatmann 1 (Whatman Inc., Clifton, N.J.) con los siguientes solventes:

Solvente A: 1-butanol/piridina/agua, 6:4:3 v/v (Jeanes et al., 1951).

Solvente B: isopropanol/ácido acético/agua, 27:4:9 v/v (Tung y Nordin, 1968).

Solvente C: benceno/ácido acético/agua, 2:2:1 v/v

Solvente D: ácido acético 5%

FPLC

Las fracciones de [¹⁴C]-glucano y [¹⁴C]-manano purificadas a través de la columna de Con-A fueron sometidas a una cromatografía en FPLC (Pharmacia-LKB System) usando una columna de filtración por geles de Superosa 6 HR 10/30. Se eluyó con buffer Tris/HCl 100 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0). El flujo utilizado en todas las corridas fue 0.5 ml/min. La columna fue calibrada utilizando Blue-Dextran como estandares de PM. Los polisacáridos fueron localizados midiendo la radioactividad en alícuotas de cada fracción en un contador de centelleo líquido con solución de Bray.

HPLC

El análisis de los productos de hidrólisis total del EEC se realizó en una columna Aminex HPX-87C (Bio-Rad), corrida a un flujo de 0.2 ml/min a 60 °C en un equipo de HPLC. Se eluyó con H₂O.

Los compuestos fenólicos fueron analizados en una columna de fase reversa (C18, ODS-2, Pharmacia) corrida a un flujo de 1 ml/min en un equipo de HPLC. Se eluyó con un gradiente lineal desde 100% de solvente A (ácido acético 0.6%) hasta 50% de solvente B (acetonitrilo).

Marcación de proteínas con [³⁵S]-Metionina

Los cultivos de zanahoria fueron incubados durante 5 h con el EEC de *S. sclerotiorum*, al cabo de las cuales se agregó [³⁵S]-Metionina al medio de cultivo de estas células, así como también a un cultivo no tratado con el EEC. Las células fueron cosechadas al cabo de un pulso de 90 min y fueron rotas en un eppendorf con una varilla en buffer Tris-ClH 50 mM (pH 6.8), PMSF 1 mM. Se centrifugó a 10.000 x g 10 min y las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con TCA 15%. La fracción insoluble fue desnaturalizada durante 2 min a 100 °C con SDS 2%, β mercapto etanol 2%, urea 8 M, y sometida a una electroforesis en gel de SDS-PAGE 10%. La tinción de proteínas y la fluorografía fue desarrollada según lo descrito por Zorreguieta y Ugalde (1986).

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción de ADN

El ADN genómico de zanahoria fue preparado a partir de los cultivos en suspensión de zanahoria por el método de Reichardt y Rogers (1994).

Para la preparación de plásmidos se utilizó el método de Birboin y Dolly (Maniatis et al. 1982).

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA fue preparado a partir de los cultivos en suspensión de zanahoria de acuerdo al método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico, el RNA fue tratado con DNasa libre de RNasa (Promega) de acuerdo a lo indicado por los fabricantes.

Para la transcripción reversa se utilizaron 5 µg de RNA total. La síntesis de la primera cadena de cDNA se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl₂ 50 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 10 mM, dNTP 500 µM de cada uno, inhibidor de RNasa 20 U (Promega), M-MLV transcriptasa reversa (Gibco BRL) 200 U y 25 pmoles del oligonucleótido 5'-T₁ 1NM-3' como primer (en donde NM

representan combinaciones de las bases A,T,C,G), en un volumen total de 30 μ l. La reacción fue incubada a 37 °C durante 1 h, y luego de inactivar a la enzima por calentamiento a 95 °C durante 5 min, se tomaron alícuotas de 3 μ l como sustrato para las reacciones de “differential display”

Reacción de differential display

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), MgCl₂ 2mM, dNTPs 2 μ M, [α -³⁵S]dATP 0.5 μ M, taq polimerasa 2U y los primers especificados en cada caso, siempre utilizando 2.5 μ M del mismo primer 5'-T₁₁NM-3' usado para la síntesis del cDNA y 0.5 μ M de un primer de secuencia arbitraria de 10-mer. La mezcla de reacción fue cubierta con 100 μ l de aceite mineral; calentada 5 min a 94 °C y luego sometida a 40 ciclos de 3 pasos (30 seg de desnaturalización a 94 °C, 1 min de annealing a 42 °C y 30 seg de extensión a 72 °C), seguido de 10 min a 72 °C, en un ciclador térmico Perkin Elmer 480. Posteriormente, los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en un gel de secuencia de DNA (poliacrilamida al 6%).

Los geles fueron secados al vacío con calentamiento (80 °C) sobre papel Wathmann 3MM y expuestos sobre una película Kodak BIOMAX durante 24 h. Una vez identificadas, las bandas de interés fueron cortadas del papel e incubadas en 100 μ l de agua durante 2 h a temperatura ambiente para eluir el fragmento de DNA amplificado.

Estos fragmentos fueron reamplificados con el mismo set de primers usados para el differential display, las PCRs se llevaron a cabo en las mismas condiciones, a excepción de que no se usó [α -³⁵S]dATP y se incrementó en 10 veces la concentración de los dNTPs. Los productos de las reacciones fueron resueltos en geles de agarosa 1.6%.

Clonado y secuenciación de fragmentos de DNA

Las bandas reamplificadas fueron extraídas de los geles de agarosa utilizando la técnica de Gene-Clean (BIO 101), se clonaron en el vector pGEM-T (Promega) y fueron introducidos en *E. coli* XL1-Blue.

Se realizaron minipreparaciones de DNA doble cadena (Maniatis *et al.*, 1982) o simple cadena por inducción con el fago R408 (Russel *et al.*, 1986).

La secuenciación del DNA fue llevada a cabo empleando el método de los terminadores de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Las reacciones se realizaron utilizando el sistema comercial Sequenase 2.0 (United States Biochemical Corp.) y [α -³⁵S]dATP, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Cuando fue posible se utilizaron los *primers* pUC/M13

forward y *reverse*. En otros casos, se utilizaron oligonucleótidos diseñados especialmente, provistos por GIBCO-BRL.

Clonado de la secuencia completa de cDNA de iEP4

Se utilizó la técnica de RACE (5'-Rapid amplification of cDNA ends). La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema comercial provisto por GIBCO-BRL. En primer lugar, a partir de RNA total se sintetizó la cadena de cDNA con el primer DCC 20. Luego de una incubación con RNasa (RNasa libre de DNasa, 1U; MgCl₂ 10 mM) el cDNA fue purificado con GlassMax spin cartridges (GIBCO-BRL). Posteriormente fue incubado con deoxi-citosina (dC) y con la enzima deoxinucleotidil-terminal transferasa (10 U/ml) por 10 min a 37 °C. El producto de esta reacción fue amplificado por 2 rondas sucesivas de PCR: en la primera reacción se utilizaron los primers DCC20 (400 nM) y (dG)-Anchor (400 nM) y en la reacción siguiente se emplearon primers UAP (400 nM) y DCC21 (400 nM). En ambos casos la composición final de los demás reactivos fue: Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, deoxinucleótidos 200 mM de cada uno y 0.04 unidades de *Taq* DNA polimerasa.

Las secuencias de DNA y proteínas fueron analizadas con el programa de computación personal DNA Strider. La búsqueda de homología con secuencias conocidas se llevó a cabo en el NCBI, usando el algoritmo BLAST X (Gish and States, 1993).

Electroforesis en geles de agarosa

Se realizaron electroforesis horizontales, utilizando como buffer de corrida TAE 0.5x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.0). La agarosa se utilizó en concentraciones entre 0.6 y 1.6% dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, adicionada con 1 µg/ml de bromuro de etidio. Los geles se desarrollaron a 1-5 V/cm durante el tiempo necesario para la separación adecuada. La posición de las bandas se visualizó con un iluminador UV de marca FOTODYNE. Como marcadores de peso molecular se utilizaron digestos de fago lambda con la enzima *Hind III*, de fago φx 174 con la enzima *Hae III* y DNA ladder.

Transferencia de RNA a membranas de nitrocelulosa (Northern blot) e hibridización

Las muestras de RNA fueron corridos en geles de agarosa 1.2% en presencia de formaldehído 0.4 M. El gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) de acuerdo a lo descrito por Maniatis y col. (1982). Las membranas fueron teñidas con azul de metileno 0.04% en acetato de sodio 500 mM (pH 5.2). Las sondas radioactivas utilizadas en las hibridizaciones fueron preparadas con el sistema comercial Random Primed DNA Labeling Kit (GIBCO-BRL). Los procesos de prehibridización, hibridización y lavado de las membranas fueron llevados a

cabo según lo descripto por Church y Gilbert (1984). Las membranas fueron expuestas a placas autoradiográficas con pantalla intensificadora.

Reacciones de PCR

En los casos en que ésta técnica fue utilizada como herramienta para analizar la presencia o ausencia y el tamaño de fragmentos amplificables las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 μ l conteniendo: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), MgCl₂ 2mM, dNTPs 200 μ M, [α -³⁵S]dATP 0.5 μ M, taq polimerasa 2U y los primers especificados en cada caso. La mezcla de reacción fue cubierta con 100 μ l de aceite mineral; calentada 5 min a 94 °C y luego sometida a 35 ciclos de 3 pasos (1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de annealing a 46 °C y 30 seg de extensión a 72 °C), seguido de 10 min a 72 °C, en un ciclador térmico Perkin Elmer 480. Posteriormente, los productos fueron analizados en geles de agarosa 1.6%.

En la siguiente lista se detalla la secuencia de los primers utilizados en las diferentes reacciones:

DCC 4 5'-tcacatgtctctgcatcttcaca-3'

DCC 6 5'-tacacagcaggatttcacaggg-3'

DCC 10 5'-gaaaatcctgcagagtacataaac-3'

DCC 11 5'-tcacatgtctctgcatcttcaca-3'

DCC 20 5'-ccgtttatttgaatatcctctta-3'

DCC 21 5'-taatcctcttacaacaacagat-3'

CAL 1 5'-gcggccgcctcaaatacatcata-3'

CAL 2 5'-tggtgatgggcagatcaactatga-3'

ACT 1 5'-tctgctggaatccatgaaactactt-3'

ACT 2 5'-cgagatccacatctgctggaagta-3'

BIBLIOGRAFÍA

- Apte, S.S., Mattei, M. G., Seldin, M. and Olsen, B.** 1995. The highly conserved defender against the death 1 (*dad-1*) gene maps to human chromosome 14q11-q12 and mouse chromosome 14 and has plant and nematode homologs. *FEBS Lett.* 363: 304-306.
- Ayers, A.R., Ebel, J., Finelli, F., Berger, N. and Albersheim, P.** 1976a. Host-pathogen interactions. IX Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57: 751-759.
- Ayers, A.R., Ebel, J., Valent, B. and Albersheim, P.** 1976b. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57: 760-765.
- Baron, C. and Zambryski P.** 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme?. *Annu. Rev. Genetics* 29: 107-129.
- Bauer, W.D., Bateman, D.F. and Whalen, C.H.** 1977. Purification of an endo- β -1,4-galactanase produced by *Sclerotinia sclerotiorum*: effects on isolated plant cell walls and potato tissue. *Phytopathology* 67: 862-869.
- Basse, C., Fath, A. and Boller, T.** (1993). High affinity binding of a glucopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *J. Biol. Chem.* 268: 14724-14731.
- Basset, P., Bellocq, J., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J., Podhajcer, O., Chenard, M., Rio, M. and Chambon, P.** 1990. *Nature.* 348: 699-704.
- Bazzalo, M.E., Heber, E.M., Del Pero Martinez, M.A. and Caso, O.H.** 1985. Phenolic compounds in stress of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on the fungus. *Phytopathology* 112: 322-332.
- Benhamou, N.** 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science.* 1:233-240.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. and Staskawicz, B.J.** 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant resistance genes. *Science* 265: 1856-1860.
- Bloch, C.B., De Wit, P.J.G.M. and Kùc, J.** 1984. *Physiol. Plant Pathol.* 25: 199-208.
- Bolwell, P., Robbins, M. and Dixon, R.** 1985. Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. *Eur. J. Biochem.* 148: 571-578.

- Bowles, D.** 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem* 50: 873-907.
- Brady, K, Darvill, A. and Albersheim, P.** 1993. Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. *Plant J.* 4: 517-524.
- Brigs, S.P. and Johal, G.S.** 1994. Genetic patterns of plant host-parasite interactions. *Trends Genet.* Vol. 10, 1: 12-16.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. and Lamb, C.J.** 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712.
- Burnet, F.** 1951. *Physiol. Rev.* 31: 131-150.
- Camm, E. and Towers, G.** 1973. Phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 12: 961-973.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S. and Dong, X.** 1994. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic Acquired resistance. *Plant cell* 6: 1583-1592.
- Carpita, N., Montezinos, D., Sabularse, D. and Delmer, D.** 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plants. *Science* 205: 5770-5778.
- Cervone et al.** 1990. Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* 29: 447-449.
- Chasan, R.** 1994. Plant-Pathogen Encounters in Edinburgh. Meeting report. *Plant Cell* 6: 1332-1341.
- Chen, J. and Varner, J.** 1985. An extracellular matrix protein in plants: characterization of a genomic clone for carrot extensin. *EMBO J.* 4: 2145-2151.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Church, G. and Gilbert, W.** 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1991-1995.
- Cosio, E., Frey, T., Verduyn, R., Van Boom, J. and Ebel, J.** 1990. High affinity binding of a synthetic heptaglycoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* 271: 223-226.
- Côté, F. and Hahn, M.** 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 26: 1379-1411.
- Côté, F., Cheong, J., Alba, R. and Hahn, M.** 1995. Characterization of binding proteins that recognize oligoglycoside elicitors of phytoalexin synthesis in soybean. *Physiol. Plantarum* 93: 401-410.

- Cramer, C.L., Ryder, T.B., Bell, J.N. and Lamb, C.J.** 1984. Rapid switching of plant gene expression induced by fungal elicitor. *Science* 227:1240-1242.
- Cramer, C.L., Bell, J., Ryder, T.B., Bailey, J., Schuch, W., Bolwell, G., Robbins, M., Dixon, R. and Lamb, C.J.** 1985. Coordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean. *EMBO J.* 4: 285-289.
- Creamer, J.R. and Bostock, R.M.** 1986. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28: 215-225.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. and Mullet, J.E.** 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4938-4941.
- Dangl, J.L., Hauffe, K.D., Lipphart, S., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** 1987. Parsley Protoplasts Retain Differential Responsiveness to UV Light and Fungal Elicitor. *EMBO* 6: 2551-2556.
- Dangl, J.L.** 1995. Piece de Résistance: novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* 80: 363-366.
- Darvill, A.G. and Albersheim, P.** 1984. Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-275.
- Delaney, T.P.** 1994. *Science* 261: 1247-1251.
- Dénarié, J. and Cullimore, J.** 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74: 951-954.
- De Stevens, G.** 1955. In *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N. O., eds.) Vol. 1 pp. 173—177, Academic Press, New York.
- De Wit, P.J.G.M. and Spikman, G.** 1982. Evidence for the occurrence of race-and-cultivar-specific elicitors of necrosis intercellular fluids of compatible interactions between *Cladosporium fulvum* and Tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 1-11.
- Dickman, M.B., Podila, G.K. and Kolattukudy, P.E.** 1989. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* 342: 446-448.
- Dickstein, R., Prusty, R., Peng, T., Ngo, W. and Smith, M.** 1993. ENOD8, a novel early nodule-specific gene, is expressed in empty alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 715-721.
- Dietrich, A., Mayer, J.E. and Hahlbrock, K.** 1990. Fungal elicitor triggers rapid, transient and specific protein phosphorylation in Parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265: 6360-6368.
- Dietrich, R.A., Delaney T., Uknes, S., Ward, E., Ryals, J. and Dangl, J.** 1994. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77: 565-577.

- Dische, Z.** 1962. Methods Carbohydr. Chem. 1: 478-492.
- Dixon, R. and Lamb, C.** 1979. Stimulation of the novo synthesis of phenilalanine ammonia-lyase in relation to phytoalexin accumulation in *C. lindemuthianum* elicitor-treated cell suspension cultures of french bean. Biochim. et Biophys. Acta 586: 453-463.
- Dixon, R.A. and Harrison, M.J.** 1990. Activation, structure and organization of genes in microbial defense in plants. Adv. Genet. 28: 165-234.
- Dixon, R. and Lamb, C.** 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 339-367.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J. and Lamb, C.J.** 1994. Early events in the activation of plant defense responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 479-501.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L.** 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7: 1085-1097.
- Donohoe, P., Alberts, G., Hampton, B. and Winkles, J.** 1994. A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. J. Biol. Chem. 269: 8604-8609.
- Ebel, J., Ayers, A. and Albersheim, P.** 1976. Host-pathogen interactions. XII. The response of suspension-cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. Plant Physiol. 57: 775-779.
- Edwards, K., Cramer, C., Bolwell, P., Dixon, R., Schuch, W. and Lamb, C.** 1985. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6731-6735.
- Ellis, J., Jennings, A.C., Edwards, L.A., Mavandad, M., Lamb, C.J. and Dixon, R.A.** 1989. Defense Gene Expression in Elicitor-Treated Cell Suspension Cultures of French Bean cv. Imuna. Plant Cell Reports 8: 504-507.
- Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Finnegan, E.J. and Anderson, P.A.** 1995. Contrasting complexity of two rust resistance loci in flax. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4185-4188.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, Y.** 1992. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. Cell 70: 879-886.
- Favaron, F., Alghisi, P. and Marciano, P.** 1992. Characterization of two *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonases with different abilities to elicit glyceollin in soybean. Plant Science 83: 7-13.
- Flaishman, M.A. and Kolattukudy, P.E.** 1994. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6579-6583.
- Flor, H.H.** 1956. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. J. Agric. Res. 73: 335-357.

- Flor, H.H.** 1971. Current status for the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Forster, A.B.** 1957. *Advan. Carb. Chem.* 12: 81.
- Fritzmeier, K., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Scheel, D. and Hahlbrock, K.** 1987. Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 85: 34-41.
- Gabriel, D. and Rolfe, B.** 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 365-391.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J.** 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Glazebrook, J. and Ausubel, F.** 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8955-8959.
- Gish, W. and States, D.** 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* 3: 266-272.
- Greenberg, J. and Ausubel, F.M.** 1993. Arabidopsis mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J.* 4: 327-341.
- Greenberg, J., Guo, A., Klessig, D.F. and Ausubel, F.M.** 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77: 551-563.
- Hadwiger, L.A. and Culley, D.E.** 1993. Nonhost resistance genes and race0specific resistance. *Trends Microbiol.* 1: 136-141.
- Habereeder, H., Schröder, G. and Ebel, J.** 1989. Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. *Planta* 177: 58-65.
- Haddon, L. and Northcote, D.** 1976. *Planta* 128: 255-262.
- Hahlbrock, K. and Grisenbach, H.** 1979. Enzymatic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 105-130.
- Hahlbrock, K., Lamb, C., Purwin, C., Ebel, J., Fautz, E. and Schafer, E.** 1981. Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophthora megasperma* var. *sojajae*. *Plant Physiol.* 67: 768-773.

- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nurnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. and Schmelzer, E.** 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:4150-4157.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindi, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P., Stocker, R. and Stenzel, K.** 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.
- Ham, K., Kauffmann, S., Albersheim, P. and Darvill, A.** 1991. Host-pathogen interactions XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with β -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 545-552.
- Hancock, J.G.** 1966. Degradation of pectic substances associated with patogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 56: 975-979.
- Hancock, J.G.** 1967. Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 57: 203-206.
- Hargreaves, J.A. and Bailey, J.A.** 1978. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 89-100.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J.** 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
- Holliday, M.J., Keen, N.T. and Long, M.** 1981. Cell death patterns and accumulation of fluorescent material in the hypersensitive response of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 279-287.
- Horvath, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M. and Spaink, H.** 1993. Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* 4: 727-733.
- Hrmova, M., Harvey, A., Wang, J., Shirley, N., Jones, G., Stone, B., Høj, P. and Fincher, G.** 1996. Barley β -D-Glucan exohydrolases with β -D-glucosidase activity. Purification, characterization, and determination of primary structure from cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 271: 5277-5286.
- Hughes, R. and Dickerson, A.** 1991. Modulation of elicitor-induced chitinase and β -1,3-glucanase activity by hormones in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 32: 853-861.
- Iñón de Iannino, N. and Ugalde, R.A.** 1993. Biosynthesis of cyclic β -1,3- β -1,6 glucan in *Bradyrhizobium* Spp. *Arch. Microbiol.* 159: 30-38.
- Isaac, S.** 1992. Mechanisms of disease resistance. En: *Fungal-Plant Interactions*. Chapman & Hall (eds). pp. 186-208.

- Jacob, M. and Gallinaro, H.** 1989. The 5' splice site: phylogenetic evolution and variable geometry of association with U1RNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 2159-2180.
- Jeanes, A., Wise, L. S. and Dimler, R. J.** 1951. Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.* 23: 415-420.
- Jones, D.** 1970. Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 54: 351-360.
- Joosten, M.H. and De Wit, P.J.** 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiol.* 89: 945-951.
- Joshi, C.** 1987. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucl. Acids Res.* 15: 9627-9640.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B.** 1987. Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* 6: 3209-3212.
- Keen, N. and Yoshikawa, M.** 1983. β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol.* 71: 460-465.
- Keen, N., Yoshikawa, M. and Wang, M.** 1983. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* and other sources. *Plant Physiol.* 71: 466-471.
- Keen, N.T.** 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 19: 109-122.
- Keen, N.T., Bent, A. and Staskawicz, B.J.** 1993. En: *Biotechnology in plant disease control*, Y. Chet, De. (Wiley, New York) pp. 65-88.
- Klessig, D.F. and Malamy, J.** 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1439-1458.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J.** 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19: 415-421.
- Kohn, L.M.** 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 881-886.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C. and Flaishman, M.A.** 1995. Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4080-4087.
- Kombrink, E., Schroder, M. and Hahlbrock, K.** 1988. Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 782-786.

- Kozak, M.** 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiation codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.** 1986. Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Plant Cell Physiol.* 27: 1587-1591.
- Lamarque, C.** 1976. Elements de biologie du *Sclerotinia sclerotiorum* sur tournesol en France. Information Techniques. CETIOM, n° 49.
- Lawton, M.A. and Lamb, C.J.** 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Mol. Cell. Biol.* 7: 335-341.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooj, B., Uknes, S. and Ryals, J.** 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 8: 863-870.
- Lee, S., Tomasetto, C. and Sager, R.** 1991. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2825-2829.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B.** 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6748-6754
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C.** 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Liang, P. and Pardee, A.** 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R. and Pardee, A.** 1992. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 52: 6966-6968.
- Liang, P., Averboukh, L., and Pardee, A.** 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl. Acids Res.* 21: 3269-3275.
- Lindsay, W.P., Lamb, C.J. and Dixon, R.A.** 1993. Microbial recognition and activation of plant defense systems. *Trends Microbiol.* 1: 181-187.
- Logemann, E., Wu, S., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, Y. and Hahlbrock, K.** 1995. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *Plant J.* 8: 865-876.
- Lutcke, H., Chow, K., Michel, F., Moss, K., Kern, H. and Scheele, G.** 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plant and animals. *EMBO J.* 6: 43-48.

Mahé, A., Grisvard, J. and Dron, M. 1993. Two avirulent races of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger different time courses of plant defense reactions in bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 423-428.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Marciano, P., Di Lenna, P. and Magro, P. 1982. Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 201-212.

Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1432-1436.

Martin, G.B., Frary, A., Wu, T., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. 1994. A member of the tomato *Pto* gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. *Plant Cell* 6: 1543-1552.

Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.

Maxwell, D.P. and Lumsden, R.D. 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* infected bean and in culture. *Phytopathology* 60: 1395-1398.

Medhy, M.C. and Lamb, C.J. 1987. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *EMBO J.* 6: 1527-1533.

Meeley, R., Johal, G., Briggs, S. and Walton, J. 1992. A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell* 4: 71-77.

Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G. and Ausubel, F.M. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78: 1089-1099.

Mittler, R. and Lam, E. 1996. Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol.* 4: 10-15.

Mouly, A., Rumeau, D. and Esquerré-Tugayé, M.T. 1992. Differential accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein transcripts in sunflower plants infected with *Sclerotinia sclerotiorum* or treated with oxalic acid. *Plant Science* 85: 51-59.

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S. and Nishimoto, T. 1993. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6367-6374.

- Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev. Phytopathol* 30: 369-389.
- Noyes, R.D. and Hancock, J.G.** 1981. Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 123-132.
- Nurnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** 1994. High Affinity Binding of a Fungal Oligopeptide Elicitor to Parsley Plasma Membranes Triggers Multiple Defense Responses. *Cell* 78: 449-460.
- O'Farrel, P.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Panaccione, D.G., Scott-Craig, J.S., Pocard, J.A. and Walton, J.D.** 1992. A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on mize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6590-6594.
- Purdy, L.H.** 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology. Host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* 69: 875-880.
- Quesada-Allué, L., Hagelin, K. and LoSchiavo, F.** 1993. Xylose transfer to lipids by membranes of carrot cell suspensions. *Phytochemistry* 33: 1347-1352.
- Raschke, W. and Ballou, C.** 1972. Characterization of a yeast mannan containing N-acetyl-D-glucosamine as an immunological determinant. *Biochemistry* 11: 3807-3816.
- Raskin, I.** 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:439-463.
- Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre, M.** 1991. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1478-1484.
- Russel, M., Kidd, S. and Kelley, M.R.** 1986. An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene* 45: 333-338.
- Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E.** 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104: 1109-1112.
- Ryan, C.** 1988. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry* 27: 8879-8883.
- Ryerson, D. and Heath, M.** 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* 8: 393-402.
- Sager, R., Anisowicz, A., Neveu, M., Liang, P. and Sotiropoulou, G.** 1993. Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J.* 7: 964-970.

- Salmeron, J.M., Barker, S.J., Carland, F.M., Mehta, A.Y. and Staskawicz, B.J.** 1994. Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell* 6: 511.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Carlson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Satoh, S., Sturm, A., Fujii, T. and Chrispeels, M.** 1992. cDNA cloning of an extracellular dermal glycoprotein of carrot and its expression in response to wounding. *Planta* 188: 432-438.
- Scheel, D., Colling, C., Hedrich, R., Kawalleck, P., Parker, J.E., Sacks, W.R., Somssich, I.E. and Hahlbrock, K.** 1991. Signals in plant defense gene activation. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1, pp. 373-380. Hennecke and Verma (eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Schemelzer, E., Kruger-Lebus, S. and Hahlbrock, K.** 1989. Temporal and spacial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. *Plant Cell* 1: 993-1001.
- Sharma, Y. and Davis, K.** 1995. Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. *Plant Mol. Biol.* 29: 91-98.
- Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K. and Maliarik, M.** 1993. Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetyl chitoligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspensio-cultured rice cells. *FEBS Lett.* 329: 75-78.
- Scott-Craig, J.S, Panaccione, D.G., Pocard, J.A. and Walton, J.D.** 1992. The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame. *J. Biol. Chem.* 267: 26044-26049.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B., Ellis, J.G. and Jones, J.D.** 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Sugimoto, A., Hozak, R., Nakashima, T., Nishimoto, T. and Rothman, J.** 1995. *dad-1*, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *EMBO J.* 14: 4434-4441.
- Sutton, D.C. and Deverall, B.J.** 1984. Phytoalexin accumulation during infection of bean and soybean by ascospores and mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol.* 33: 377-383.
- Trevelyan, W. F., Procter, D. P. and Harrison, J. S.** 1950. Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature (London)*. 166: 444-445.
- Tung, K.K. and Nordin, J.H.** 1968. Structure of the tetrasaccharide produced by the hydrolysis of nigeran by the enzyme mycodextranase. *Biochim. Biophys. Acta* 158: 154-156.

- Van den Ackerveken, G.F., Van Kan J.A. and De Wit, P.J.** 1992. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J.* 2: 359-366.
- Van der Knaap, E. and Kende, H.** 1995. Identification of a gibberellin-induced gene in deepwater rice using differential display of mRNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 589-592.
- Van Engelen F., de Jong, A., Meijer, E., Kuil, C., Meyboom, J., Dirkse, W., Booij, H., Hartog, M., Vandekerckhove, J., de Vries, S. and Van Kammen, A.** 1995. Purification, immunological characterization and cDNA cloning of a 47 KDa glycoprotein secreted by carrot suspension cells. *Plant Mol. Biol.* 27: 901-910.
- Van Kan, J.A., Van den Ackerveken, G.F. and De Wit, P.J.** 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 52-59.
- Von Heijne, G.** 1983. Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 133: 17-21.
- Walton, J.D., Earle, E.D., and Gibson, B.W.** 1982. Purification and structure of the host-specific toxin from *Helminthosporium carbonum* race 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 785-794.
- Walton, J.D. and Holden, F.R.** 1988. Properties of two enzymes involved in the biosynthesis of the fungal pathogenicity factor HC-toxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 128-134.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. and Gilchrist, D.** 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8: 375-391.
- Ward, E., Uknes, S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl-Goy, P., Metraux, J. and Ryals, J.** 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B.** 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.
- Wilkinson, J., Lanahan, M., Conner, T. and Klee, H.** 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27: 1097-1108.
- Wu, L., Ueda, T. and Messing, J.** 1995. The formation of mRNA 3'-ends in plants. *Plant J.* 8: 323-329.
- Zhang, L. and Medina, D.** 1993. Gene expression screening for specific associated with mouse mammary tumor development. *Mol. Carcinogen.* 8: 123-126.

Zielinski, R. E. 1995. Carrot Ccam-1 gene for calmodulin. Gene Bank: DCCAM1G.

Zimmer, D.E. and Hoes, J.A. 1978. Diseases. En: Sunflower Science and technology. J.F. Carter De. ASA, CSSA, SSSA. Wisconsin. pp. 225-262.

Zorreguieta, A. and Ugalde, R. 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* Spp. of a 235 Kilodalton protein intermediate in β -D-(1-2) glucan synthesis. J. Bacteriol. 167: 947-951.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. E. Zielinski', is written over a thin, slightly curved horizontal line.